



## **PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen**

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/107360>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-06 and may be subject to change.

BEPALING VAN ALDOSTERON  
MET BEHULP VAN  
EEN DUBBEL-ISOTOOP METHODE

TH. J. BENRAAD

BEPALING VAN ALDOSTERON  
MET BEHULP VAN EEN DUBBEL-ISOTOOP METHODE

PROMOTOR: PROF. DR. S.L. BONTING

**BEPALING VAN ALDOSTERON  
MET BEHULP VAN  
EEN DUBBEL-ISOTOOP METHODE**

**PROEFSCHRIFT**

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR  
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS  
DR. S.J. GEERTS,  
HOOGLERAAR IN DE FACULTEITEN DER GENEESKUNDE  
EN DER WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN,  
VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT  
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN  
OP DINSDAG 28 JUNI 1966  
DES NAMIDDAGS TE 2 UUR

DOOR

**THEODORUS JOHANNES BENRAAD**

GEBOREN TE TERBORG

1966

THOBEN OFFSET NIJMEGEN

De Nederlandse Organisatie voor Zuiver-Wetenschappelijk Onderzoek (Z.W.O.) verleende subsidie voor dit onderzoek.

In de loop van dit onderzoek is een steeds hechtere samenwerking ontstaan tussen de schrijver en P.W.C.Kloppenborg, internist aan de Universiteitskliniek voor inwendige ziekten, in het bijzonder door de vruchtbare wijze waarop hij door discussie en eigen arbeid deelnam aan de verdere ontwikkeling van de methode.

Ter nagedachtenis aan mijn Vader  
Aan mijn Moeder

Dit onderzoek werd verricht in het laboratorium voor Medische Biologie  
van de Katholieke Universiteit te Nijmegen.

(Directeur: Dr. W.J. van Dongen)



## INLEIDING

Sinds de ontdekking van aldosteron zijn talrijke onderzoeken verricht naar de functie van dit hormon. De belangstelling voor het mineralocorticoid werd niet alleen gewekt door zijn fysiologische functie, maar tevens door de rol die het speelt onder pathologische omstandigheden. Momenteel staat de betekenis van aldosteron bij de pathogenese van hypertensie in het centrum van de belangstelling.

Bij de mens wordt onder normale omstandigheden per dag circa 100 microgram aldosteron geproduceerd; de hoeveelheid die voor meting van de excretie en de secretiesnelheid beschikbaar is, is derhalve zeer gering. Aangezien tot op heden geen specifieke chemische reactie op aldosteron bekend is, moet het steroid voor de uiteindelijke meting volledig zuiver uit het biologische milieu worden geïsoleerd. De isolering geschiedt door middel van chromatografie en dientengevolge wordt de specificiteit van de meting bepaald door de gebruikte chromatografische procedure.

Voor een betrouwbare kwantitatieve analyse is men aangewezen op een radiometrische bepalingmethode. Een dergelijke methode werd in 1960 beschreven door KLIMAN en PETERSON. Deze vormde het uitgangspunt bij de ontwikkeling van de in dit proefschrift beschreven bepaling van aldosteron. Door in hoofdzaak gebruik te maken van dunne-laagchromatografie in plaats van papierchromatografie werd een methode verkregen, die eenvoudiger is van uitvoering met behoud van een minstens even grote betrouwbaarheid.

In dit proefschrift wordt de methode beschreven en verantwoord. Speciale aandacht wordt geschonken aan de specificiteit van de bepaling. De methode is toegepast in klinische observaties die zijn beschreven in het proefschrift van KLOPPENBORG (1966).

# I N H O U D

Blz.

INLEIDING . . . . .	7
---------------------	---

## HOOFDSTUK I:

HISTORISCH OVERZICHT VAN DE ONTDEKKING VAN ALDOSTERON . . . . .	11
---	----

## HOOFDSTUK II:

METABOLISME VAN ALDOSTERON BIJ DE MENS . . . . .	21
§ 1. Inleiding . . . . .	21
§ 2. De metaboliëten van aldosteron . . . . .	21
§ 3. De structuur van het 3-oxo-conjugaat . . . . .	24
§ 4. De plaats van de stofwisseling van aldosteron . . . . .	25
§ 5. Veranderingen van het metabolisme van aldosteron tijdens de zwangerschap en onder pathologische omstandigheden . . . . .	26

## HOOFDSTUK III:

METHODEN VOOR DE BEPALING VAN ALDOSTERON IN BIOLOGISCHE MEDIA . . . . .	29
§ 1. Inleiding . . . . .	29
§ 2. Noodzakelijke bewerkingen voor de chromatografische scheiding . . . . .	30
§ 3. Modificerende reacties als middel tot verhoging van de efficiëntie van de chromatografische scheiding . . . . .	31
§ 4. Chromatografie van aldosteron . . . . .	33
§ 5. Meting van aldosteron met behulp van spectrofotometrische en fluorimetrische reacties . . . . .	43
§ 6. Meting van aldosteron met behulp van isotopen . . . . .	46

## HOOFDSTUK IV:

BESCHRIJVING VAN DE EIGEN METHODE . . . . .	51
§ 1. Inleiding . . . . .	51
§ 2. Reagentia en materialen . . . . .	52
§ 3. Apparatuur . . . . .	54
§ 4. Uitvoering van de bepaling van aldosteron . . . . .	54
§ 5. Meting van de secretiesnelheid van aldosteron . . . . .	61

§ 6. Bijzonderheden betreffende de uitvoering van de chromatografie . . . . .	62
§ 7. Bepaling van de specifieke activiteit van $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride . . . . .	65
HOOFDSTUK V:	
TOETSING VAN DE METHODE . . . . .	69
§ 1. Inleiding . . . . .	69
§ 2. Verantwoording van de gebruikte chromatografie-systemen . . . . .	70
§ 3. Ontleding van aldosteron tijdens dunnelaagchromatografie . . . . .	76
§ 4. De isotoopfractionering . . . . .	80
§ 5. De $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio als criterium voor de specificiteit . . . . .	88
§ 6. Hydrolyse van $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat tot $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat als criterium voor de specificiteit . . . . .	91
§ 7. De terugwinning van de tracer in de verschillende stappen van de bepaling . . . . .	95
§ 8. De blancowaarde van de bepaling . . . . .	97
§ 9. De reproduceerbaarheid van de bepaling . . . . .	98
§ 10. De nauwkeurigheid van de meting der specifieke activiteit van $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride . . . . .	101
§ 11. De nauwkeurigheid van de meting der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio bij verschillende isotopenverhoudingen . . . . .	102
§ 12. Terugwinning van aldosteron na toevoeging aan urine . . . . .	106
§ 13. Samenvatting . . . . .	109
HOOFDSTUK VI:	
TOEPASSINGEN VAN DE METHODE . . . . .	113
§ 1. Inleiding . . . . .	113
§ 2. Excretiewaarden van aldosteron . . . . .	113
§ 3. Secretiewaarden van aldosteron . . . . .	116
§ 4. Aldosteronproductie in vitro door bijnierweefsel van de rat . . . . .	122
SAMENVATTING . . . . .	129
SUMMARY . . . . .	133
BIBLIOGRAFIE . . . . .	135

## HOOFDSTUK I

### HISTORISCH OVERZICHT VAN DE ONTDEKKING VAN ALDOSTERON

Door de klinische waarnemingen van de Engelse arts Thomas ADDISON kwam de vitale functie van de bijniere voor het eerst duidelijk aan het licht. Op een bijeenkomst van de South London Medical Society in 1849, waar de eerste drie "Addison"-patiënten besproken werden, vestigde hij er de aandacht op dat anatomisch bij hen geen andere afwijking werd gevonden dan een verregaande atrofie van de bijniere. Enkele jaren later beschreef ADDISON (1855) een groter aantal ziektegevallen en kwam daarbij tot de conclusie dat de pathologie van de bijniere verantwoordelijk was voor het ziektebeeld. Deze waarnemingen vormden het uitgangspunt van talrijke studies die aan de fysiologische betekenis van de bijniere werden gewijd.

BROWN SEQUARD (1856) bestudeerde het effect van verwijdering van de bijniere bij een aantal zoogdieren. Uit de relatief korte overlevingstijden na adrenalectomie bij kat, hond, konijn en cavia concludeerde hij, dat de bijniere een essentiële functie voor het leven hebben.

Aanvankelijk verkeerde men in de veronderstelling dat het merg het vitale deel was van de bijnier, totdat BIEDL (1913) en later WHEELER en VINCENT (1917) aantoonde, dat juist het schorsgedeelte van dit orgaan voor het leven onmisbaar was.

BAUMANN en KURLAND (1927) leverde een bijdrage tot de kennis der bijnierfysiologie door experimenteel de invloed van de bijnier op de mineraalhuishouding aan te tonen. Zij zagen dat na adrenalectomie bij katten het natrium- en chloridegehalte van het plasma daalde en het kalium- en magnesiumgehalte steeg. Van deze veranderingen in concentraties van electrolyten beschouwden zij de daling van het natriumgehalte van het plasma als de meest belangrijke waarneming. Bovendien constateerden zij dat door toevoeging van natriumzouten aan het dieet de overlevingstijd van geadrenalectomeerde katten kon worden verlengd. Dit laatste feit werd eveneens waargenomen door HARTMAN (1926) en uitgebreid beschreven door MARINE en BAUMANN (1927).

Deze gegevens kregen pas de verdiende aandacht nadat LOEB (1932) aangetoond had, dat het natriumgehalte van het plasma van patiënten in Addison-crisis significant verlaagd is. Kort daarna beschreef LOEB (1933) het gunstige effect van toediening van natriumchloride aan Addison-patiënten. Deze klinische observatie werd terstond als zeer belangrijk beschouwd en was andermaal een argument voor de betekenis

van de bijnierschors voor de mineraalhuishouding.

De bovenbesproken fysiologische functie werd door LOEB en medewerkers (1933) nader onderzocht door middel van nauwkeurige balansstudies bij bijnierloze honden. Naast de daling van het natriumgehalte van het plasma werd na verwijdering van de bijniereen versterkt natriumverlies via de urine waargenomen. HARROP en medewerkers (1933) stelden in soortgelijke experimenten vast, dat bij een toenemende graad van bijnierinsufficiëntie het kaliumgehalte van het plasma steeg, terwijl daarnaast de excretie van kalium met de urine afnam. De veranderingen van natrium- en kaliumconcentraties van het plasma gingen dus gepaard met een versterkt natriumverlies en een verhoogde kaliumretentie door de nieren.

De bijnierschors bleek niet alleen van belang te zijn voor de mineraalhuishouding, ook werden verschijnselen waargenomen die wezen op invloeden op de stofwisseling van organische metabolieten. HARROP en medewerkers (1933) zagen na adrenalectomie bij honden een verhoogde ureumconcentratie van het bloed, terwijl tevens door hen een vermindering van de uitscheiding van stikstof werd gevonden. SILVETTE en BRITTON (1932) vonden na verwijdering van de bijnier een verlaging van het glucosegehalte van het bloed en van het glycogeengehalte van de lever.

HARROP en medewerkers (1933) toonden aan dat de hierboven besproken "anorganische" en "organische" anomalieën volledig konden worden gecorrigeerd door aan de bijnierloze dieren een extract van bijnierschors toe te dienen. Reeds eerder was door een aantal onderzoekers vastgesteld dat aan bijnierschorsweefsel één of meer fysiologisch actieve stoffen door extractie konden worden onttrokken. Zo bereidden ROGOFF en STEWART (1929), HARTMAN en BROWNELL (1930), SWINGLE en PFIFFNER (1930) bijnierschorsextracten waarmee de overlevingstijd van bijnierloze dieren kon worden verlengd. Aanvankelijk verkeerden vele onderzoekers in de veronderstelling dat de biologische activiteit van deze extracten moest worden toegeschreven aan één enkel hormoon. HARTMAN (1928) sprak van "cortine". De geschiedenis zou bewijzen dat deze veronderstelling op zijn minst voorbarig was.

Hier moge een enkele opmerking volgen over de bereidingsmethoden en de ijking van deze extracten. SWINGLE en PFIFFNER (1931) gaven een methode aan waarbij bijniereen werden geëxtraheerd met alcohol, zonder dat vooraf schors- en merggedeelte werd gescheiden. De verkregen extracten waren in hoge mate toxisch wegens de aanwezigheid van adrenaline en afbraakprodukten daarvan. Deze toxische bestanddelen werden verwijderd door behandeling met het adsorbens permutiet. Deze behandeling gaf nogal eens een aanzienlijk verlies van biologische activiteit. Om deze reden werd later algemeen het voorschrift van CARTLAND en KUIZENGA (1936) gebruikt, waarbij geen adsorptieprocedure meer wordt toegepast.

In grote trekken is het voorschrift van CARTLAND en KUIZENGA als volgt. Bijnierweefsel wordt geëxtraheerd met aceton, het acetoneextract ingedampt tot een waterig residu overblijft. Dit residu wordt geëxtraheerd met petroleumether, waarmee ongewenste lipiden worden verwijderd - het residu wordt vervolgens geëxtraheerd met ethyleendichloride, waarbij de biologische activiteit overgaat in het organische oplosmiddel en adrenaline en andere verontreinigingen achterblijven in de waterige oplossing - na uisdampen van het ethyleendichloride worden resten cholesterol en andere stoffen verwijderd door partitie tussen waterige alcohol en petroleumether - de alcoholische oplossing wordt in vacuo ingedampt en aan het waterige residu wordt natriumchloride toegevoegd, waarbij een teerachtige substantie wordt neergeslagen - na sterilisatie door filtratie door een Berkefeld filter is het extract geschikt voor parenterale toediening.

Voor het meten van de activiteit van de op deze manier verkregen extracten werden biologische bepalingen ontwikkeld, berustend op het substitutie-effect bij geadrenalectomeerde dieren. Ondanks een ver doorgevoerde standaardisatie van de proefomstandigheden bleek de spreiding van de uitkomsten vaak aanzienlijk, bovendien liet de gevoeligheid van de bepalingen te wensen over.

Aanvankelijk mat men bijnierschorsactiviteit door eenvoudig de dosis vast te stellen waarmee een bijnierloos dier in leven kon worden gehouden. Later hanteerde men meer gedifferentieerde biologische en biochemische criteria. Zo maten CARTLAND en KUIZENGA (1936) naast de overlevingstijd de groei bij jonge, bijnierloze ratten. PFIFFNER en medewerkers (1934) lieten in hun "dog assay" de volgende criteria gelden:

- (i) het uitblijven van klinische symptomen als adynamie, braken, verhoogde lichaamstemperatuur
- (ii) het behoud van lichaamsgewicht
- (iii) het uitblijven van een stijging van de ureumconcentratie van het bloed.

EVERSE en DE FREMERY (1932) ontwikkelden een test die gebaseerd was op het feit dat ratten na adrenalectomie in ernstige mate spierzwakte vertonen. Door elektrische prikkeling brachten zij de kuitspier van een bijnierloze rat tot contractie. Deze contracties werden sterker wanneer stoffen met bijnierschorsactiviteit werden toegediend.

INGLE (1933, 1936) mat in een soortgelijke proefopstelling het arbeidsvermogen van de kuitspier. De spier werd nu niet enkele malen geprikkeld, maar net zolang tot een toestand van uitputting was bereikt. De arbeid die in deze periode was verricht werd gemeten.

HARROP c.s. (1936) en ook HARTMAN en SPOOR (1940) ontwikkelden tests waarin uitsluitend de invloed op de natrium- en kaliumbalans van geadrenalectomeerde honden als criterium werd gehanteerd.

Voor de tests waarin specifiek de werking op het koolhydraatmetabolisme wordt gemeten zij verwezen naar de publikaties van WELLS c.s. (1940), LEWIS c.s. (1940) en DORFMAN (1962).

Op geleide van de biologische tests werden de bijnierschorsextracten gefractioneerd. Weldra bleek dat de extracten een groot aantal fysiologisch actieve verbindingen bevatten.

De belangrijkste bijdragen tot het isoleren van deze verbindingen werden geleverd door vier groepen van onderzoekers, te weten: drie Amerikaanse, één van de Columbia Universiteit onder leiding van WINTERSTEINER en PFIFFNER, één van de Mayo Foundation, Rochester onder leiding van KENDALL, één groep medewerkers van de Upjohn Company

onder leiding van KUIZENGA en CARTLAND en de Zwitserse groep van de Technische Hogeschool te Zürich onder leiding van REICHSTEIN. De laatste werkte in nauwe samenwerking met medewerkers van Organon te Oss en met LAQUEUR van het Farmacologisch Laboratorium te Amsterdam.

De fractioneringsmethode die de Amerikaanse onderzoekers op de extracten toepasten verschilde aanzienlijk van de werkwijze van REICHSTEIN en medewerkers. Eerstgenoemden maakten gebruik van een vele malen herhaalde verdeling van het extract tussen water en benzeen, een methode die zich onderscheidt door het ontbreken van chemische reacties. REICHSTEIN daarentegen maakte bij de fractionering gebruik van een chemische reactie, daarbij steunend op een waarneming van WINTERSTEINER. Deze laatste zag, dat enkele van de door hem afgescheiden verbindingen reageerden met algemene reagentia op ketogroepen. Met behulp van een door GIRARD en SANDULESCO (1936) beschreven hydrazine-reagens scheidde REICHSTEIN de bestanddelen van het extract in een keton- en een niet-ketonfractie. Verdere scheiding van de ketonfractie bleek mogelijk door de neergeslagen hydrazonen bij verschillende pH's te hydrolyseren. In een later stadium van het onderzoek pasten KENDALL en ook REICHSTEIN adsorptiechromatografie toe over kolommen, waarbij zowel vrije als geacetylerde verbindingen werden gechromatografeerd.

De Amerikaanse en Zwitserse onderzoekers verkregen in enkele jaren een aanzienlijk aantal stoffen kristallijn in handen. De structuuropheldering van deze verbindingen moet in hoofdzaak op naam geschreven worden van REICHSTEIN, wiens werk in een grote serie publikaties werd neergelegd (zie REICHSTEIN en SHOPPEE, 1943).

Een eerste aanwijzing betreffende de grondstructuur verkreeg REICHSTEIN toen hij in samenwerking met LAQUEUR aantoonde, dat sommige van de geïsoleerde verbindingen door afbraakreacties waren om te zetten in stoffen met androgene activiteit. Dit was een aanduiding dat de oorspronkelijk geïsoleerde verbindingen behoorden tot de klasse der steroiden, zoals de bruto-formules reeds hadden doen vermoeden. In korte tijd hierna werd de structuur van vele geïsoleerde verbindingen door REICHSTEIN opgehelderd.

Later bleek dat een aantal verbindingen, die door de Amerikaanse onderzoekers waren geïsoleerd, identiek waren met door REICHSTEIN verkregen verbindingen. In 1943 beschreven REICHSTEIN en SHOPPEE een 28-tal uit bijnierschorsextracten geïsoleerde steroiden. Een groot aantal van deze stoffen bleek geen enkele biologische activiteit te bezitten; als actieve stoffen werden vermeld progesteron, oestron, androsteendion en de volgende zes corticosteroiden: cortisol (REICHSTEIN's M, KENDALL's F), cortison (KENDALL's E, REICHSTEIN's Fa, WINTERSTEINER's F), 11-desoxycortisol (REICHSTEIN's S), corticosteron (REICHSTEIN's H, KENDALL's B), 11-desoxycorticosteron

(REICHSTEIN's Q) en 11-dehydrocorticosteron (KENDALL's A) (zie figuur 1).

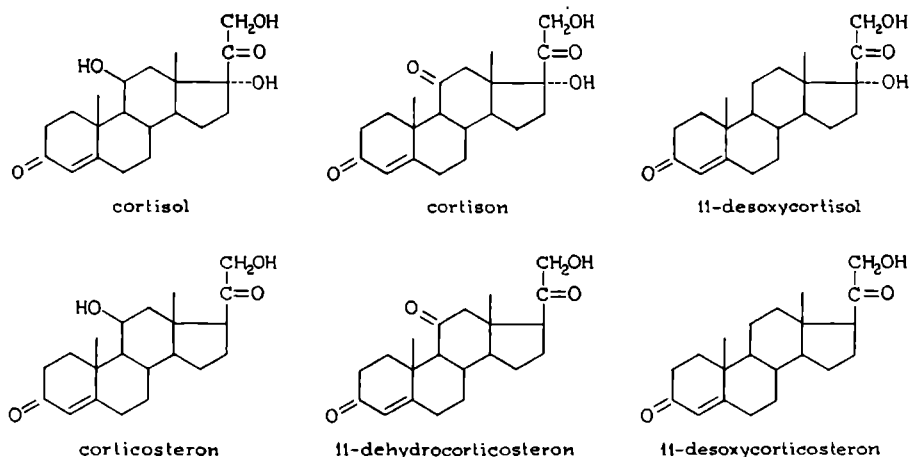


Fig. 1. Structuurformules van enkele corticosteroiden

Al deze steroiden bleken rechtsdraaiend te zijn. De actieve verbindingen waren alle  $\Delta^4$ -3-ketonen met een ketogroep aan koolstofatoom 17. Ze verschilden onderling slechts in de groepen die zich bevonden aan koolstofatoom 11 en 17. De verbindingen met een hydroxyl- of oxogroep aan koolstofatoom 11 bleken hoofdzakelijk te werken op het koolhydraatmetabolisme. Deze werking was sterker wanneer bovendien koolstofatoom 17 een hydroxylgroep droeg. Dergelijke corticosteroiden werden glucocorticoiden genoemd.

Verbindingen zonder zuurstofhoudende groep aan koolstofatoom 11 beïnvloedden hoofdzakelijk de mineraalhuishouding. Deze zogenaamde mineralocorticoiden waren bovendien sterk werkzaam in de overlevingstests en de "dog assay".

De *glucocorticoïde* activiteit van de extracten bleek geheel verklaard te kunnen worden door de in het extract gevonden glucocorticoiden. De *mineralocorticoïde* activiteit van de extracten was echter veel sterker dan de activiteit van de gezamenlijke, uit deze extracten geïsoleerde, mineralocorticoiden.

Het waren voornamelijk de Amerikaanse onderzoekers die met nadruk de aandacht vestigden op de sterke biologische activiteit van de zogenaamde "amorphous fractions". Dit zijn de verdampfingsresten van de bij de fractionering verkregen moederlogen. WINTERSTEINER en PFIFFNER (1936) beschreven amorphe fracties die in een concentratie van 2,5  $\mu$ g/kg per dag een effect hadden in de "dog assay". MASON (1939) en KENDALL (1941) verkregen amorphe fracties die vijfmaal zo



sterk werkzaam waren als desoxycorticosteronacetaat, het tot dan toe sterkst werkzaam bevonden mineralocorticoid. De amorfe fracties, die HARTMAN en SPOOR (1940) in handen kregen, vertoonden een uitzonderlijk sterk effect op de natriumretentie door de nier. Het effect was op gewichtsbasis sterker dan van enig bekend steroid. Zij spraken van een "sodiumfactor". Ook REICHSTEIN (1936a en b) maakte melding van de activiteit van amorfe fracties. Deze waren echter in de Everse-de Fremery-test duidelijk minder actief dan desoxycorticosteron. Aangenomen mag worden dat door de chemisch agressieve wijze van fractioneren de "sodiumfactor" ontleed was en geen deel meer uitmaakte van de verkregen fracties.

Tenslotte moge de waarneming van GROLLMAN worden genoemd. Op het Cold Spring Harbour Symposion van 1937 toonde deze onderzoeker kristallen, geïsoleerd uit bijnierschorsextract, met een honderd keer zo sterke werking als desoxycorticosteron in de test volgens CARTLAND en KUIZENGA. GROLLMAN had een geheel andere methode bij de isolering gebruikt dan de eerder besproken werkwijzen. Met behulp van norit-adsorptie was hij er in geslaagd deze kristallijne verbinding af te zonderen. De mogelijkheid bestaat dat GROLLMAN de eerste is geweest die aldosteron in kristallijne vorm in handen had; hiertegen pleit echter het verschil in smeltpunt van zijn verbinding en dat van aldosteron. Tot een structuuropheldering van de geïsoleerde verbinding is GROLLMAN niet gekomen.

De sterke mineralocorticoïde activiteit van de amorfe fracties bleef dus een onopgelost vraagstuk. Sommige onderzoekers waren ervan overtuigd dat er één, onbekend hormoon voor verantwoordelijk was: "the sodiumfactor". Anderen sloten de mogelijkheid niet uit dat er aan deze werking een synergetisch effect van reeds bekende steroiden ten grondslag zou liggen.

Tot de oplossing van dit probleem werd in de jaren tussen 1940 en 1950 weinig positiefs bijgedragen. In deze periode werden wel grote vorderingen gemaakt met de synthese van biologisch actieve bijnierschorssteroiden. Het door HENCH c.s. (1949) waargenomen feit, dat cortison een sterk effect had bij reumatoïde arthritis, gaf een sterke stimulans voor nader onderzoek betreffende de bijnier.

Het onderzoek naar de onverklaarde, sterke mineralocorticoïde activiteit van bijnierschorsextracten werd bevorderd door de ontwikkeling van een zeer gevoelige en betrouwbare biologische meetmethodiek door SIMPSON en TAIT (1952). Op geleide van deze test fractioneerden deze onderzoekers de extracten en konden tenslotte duidelijk vaststellen, dat de onverklaarde mineralocorticoïde activiteit veroorzaakt werd door één enkelvoudige stof.

De onderhavige biologische meting is gebaseerd op de combinatie van

het natriumretinerend en kaliumexcreterend effect van mineralocorticoiden. Zij injecteerden jonge, geadrenalectomeerde ratten met een isotopenmengsel van  $^{24}\text{Na}$  en  $^{42}\text{K}$  en verzamelden gedurende twee uren de urine. Werd een substantie met mineralocorticoïde activiteit toegediend, dan daalde de  $^{24}\text{Na} / ^{42}\text{K}$ -verhouding in de urine (SIMPSON en TAIT, 1952). Met deze test werd vastgesteld dat een extract van de bijnierschors een hogere mineralocorticoïde activiteit per gewichtseenheid vertoonde dan enig bekend bijnierschorssteroid, met uitzondering van desoxycorticosteron.

Vervolgens voerden TAIT en medewerkers klemmende argumenten aan voor de opvatting dat één, nog onbekende stof de sterke mineralocorticoïde werking van deze extracten veroorzaakte. Zij fractioneerden het extract met een van de papierchromatografische systemen die door ZAFFARONI en medewerkers (BURTON c.s. 1951) waren ontwikkeld voor de scheiding van corticosteroiden. De verdeling van de mineralocorticoïde activiteit over het chromatogram werd gemeten met behulp van de  $^{24}\text{Na} / ^{42}\text{K}$ -test. Na chromatografie in het propyleenglycol-tolueen-systeem bevond 87% van de activiteit van het oorspronkelijke extract zich op de plaats van de cortisonstandaard (TAIT, SIMPSON en GRUNDY, 1952). De activiteit kon echter onmogelijk verklaard worden door het in het extract aanwezige cortison, aangezien de hoeveelheid hiervan daarvoor ontoereikend was. Overigens bleek bij langdurige chromatografie in hetzelfde systeem (7 dagen!) het cortison toch trager te lopen dan de actieve component (GRUNDY, SIMPSON en TAIT, 1952).

Aangezien de verkregen fractie te onzuiver was voor analytisch-chemische studies, werd deze nogmaals gechromatografeerd, nu in een benzeen-methanol-water-systeem volgens BUSH (BUSH B<sub>5</sub>-systeem, 1952). De combinatie van deze systemen leverde een zuivere fractie op waaraan kon worden vastgesteld dat de mineraal-actieve component

- (i) U.V.-licht van 238 m $\mu$  absorbeerde
  - (ii) in alkalisch milieu geel fluoresceerde
  - (iii) met het tetrazoliumreagens volgens MADER en BUCK (1952) positief reageerde onder vorming van een gekleurd formazan.
- Deze gegevens wezen in de richting van een steroid met een  $\Delta^4$ -3-ketogroep (i en ii) en met een ketol-zijketen (iii).

Bij herhaalde chromatografie over verdelingskolommen bleek de biologische activiteit van de opeenvolgende fracties evenredig met de gemeten U.V.- en formazan-absorptie. De biologische activiteit van de op deze wijze verkregen mineralocorticoïde stof bleek circa 90 maal zo sterk als van desoxycorticosteron. Deze bevindingen tezamen leverden sterke argumenten voor de opvatting dat in bijnierschorsextracten een enkelvoudige stof aanwezig is met sterke mineralocorticoïde werking. SIMPSON en TAIT (1953) stelden voor deze stof "electrocortine" te noemen.

Een ander krachtig argument voor deze opvatting werd verkregen

door acetylering van de zuivere "electrocortine" fractie met  $^{14}\text{C}$  azijnzuuranhydride en chromatografie van het gevormde acetaat. Op het chromatogram werd nu een enkele "piek" gedetecteerd zowel bij meting van de radioactiviteit als bij meting met behulp van de eerder beschreven reacties. Het eluaat van deze piek vertoonde een zeer geringe mineralocorticoïde activiteit. Na hydrolyse echter van het gevormde acetaat bleken de biologische activiteit en de resultaten van de fysico-chemische bepalingen weer met elkaar overeen te stemmen. De groep van TAIT kon uit de meting van de specifieke activiteit na acetylering concluderen dat uit "electrocortine" een diacetaat was gevormd. Daarmee was aangetoond dat de stof twee acetyleerbare hydroxylgroepen bezit.

In hun in 1953 gepubliceerde studie merkten SIMPSON en TAIT reeds op dat, door gebruik te maken van deze derivaatvorming met radioactief gemerkt azijnzuuranhydride, in de toekomst een zeer gevoelige kwantitatieve bepalingsmethode voor "electrocortine" zou kunnen worden uitgewerkt. Inderdaad is tot op heden de meest gevoelige bepalingsmethode voor "electrocortine" (aldosteron) op deze derivaatvorming gebaseerd (zie hoofdstuk III).

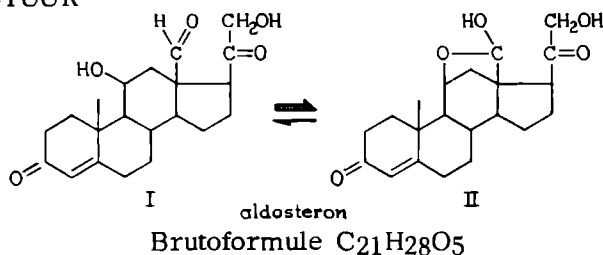
De groep van TAIT maakte eveneens aannemelijk dat "electrocortine" als een hormoon moet worden beschouwd. Uit het bijniervene-bloed van een hond werd een component geëxtraheerd die een chromatografisch gedrag vertoonde, identiek aan "electrocortine". Bovendien bleek deze stof een sterke mineralocorticoïde werking te bezitten (SIMPSON c.s. 1952).

In de laatste fase van de isolering ontstond een nauwe samenwerking tussen de Londense groep, REICHSTEIN en WETTSTEIN en NEHER. Het bijnierextract (van 500 kg runderbijnieren) waarvan men uitging was, behoudens enkele modificaties, bereid volgens CARTLAND en KUIZENGA (1936). Het extract werd via een kiezelgoerkolom gefractioneerd. Water fungeerde als stationaire fase, petroleumether en daarna benzeen-chloroformmengsels als mobiele fase. Er werden 140 fracties van ongeveer 1200 ml opgevangen in een tijdsduur van 70 dagen (I). De fracties van de kolom werden geanalyseerd met behulp van papierchromatografische systemen volgens BUSH. De "electrocortine" bevattende fracties werden vervolgens gezuiverd over een cellulosekolom met waterige methanol als stationaire en toluen-petroleumether als mobiele fase. Uit enkele fracties van deze laatste kolom kristalliseerde een stof die ongeveer honderd keer zo actief was als desoxycorticosteron in de  $^{24}\text{Na}/^{42}\text{K}$ -test. Na enige malen omkristalliseren werd 21,8 mg "analysenreines Material" verkregen (SIMPSON, TAIT, WETTSTEIN, NEHER, VON EUW, REICHSTEIN, 1953). Hier moge worden opgemerkt dat het "electrocortine" slechts kristalliseerde wanneer in de oplossing een spoor water aanwezig was. Kort na de isolering werd de structuur van het hormoon opgehelderd (SIMPSON c.s. 1954).

# T a b e l I

Enkele chemische en fysische gegevens betreffende aldosteron

## 1. STRUCTUUR



In waterige en alcoholische oplossing is voornamelijk de cyclo-halfacetaalvorm (II) aanwezig.

## 2. SYNONIEMEN

Aldosteron

Electrocortine

Corticosteron-18-aldehyde

11 $\beta$ ,21-Dihydroxypregn-4-een-3,20-dion-18-al

$\Delta^4$ -Pregneen-11 $\beta$ ,21-diol-3,18,20-trion

11 $\beta$ -Hydroxy-18-keto-cortexeen

11 $\beta$ ,21-Dihydroxy-18-aldo-4-pregneen-3,20-dion

## 3. FYSISCH GEGEVENS

Moleculair gewicht: 360,44

Specifieke draaiing:

$$[\alpha]_D^{23} = +145 \pm 2 \quad (c = 0,9896 \text{ in aceton})$$

$$n = +161 \quad (c = 0,1 \text{ in chloroform})$$

Smelpunt:

aldosteron kristalliseert uit waterige aceton/ether  
monohydraat. Smpt. 104 - 112°

anhydrisch aldosteron. Smpt. 164 - 170°

U.V.-spectrum:

$\lambda_{\text{max}}$ . 240 m $\mu$

$\epsilon = 15.000$  (moleculaire extinctiecoëfficiënt bij 240 m $\mu$ )

U.V.-spectrum na 2 uur in geconcentreerd zwavelzuur:

$\lambda_{\text{max}}$ . 288 m $\mu$

Verdelingscoëfficiënten:

methyleenchloride : water 33 : 1 (FLOOD c.s. 1961)

chloroform : water 27,2 : 1 (FLOOD c.s. 1961)

ethylacetaat : water 3,8 : 1 (UNDERWOOD c.s. 1961)

"Electrocortine" bleek te zijn het 18-aldehyde van corticosteron en de naam werd daarom veranderd in aldosteron. SCHMIDLIN c.s. (1955) bevestigden de structuur door een totaal-synthese.

In tabel I zijn enkele chemische gegevens betreffende aldosteron weergegeven.

## HOOFDSTUK II

# METABOLISME VAN ALDOSTERON BIJ DE MENS

### § 1. INLEIDING

Aldosteron wordt in het lichaam nagenoeg volledig omgezet. De vele daarbij gevormde metabolieten worden voornamelijk met de urine uitgescheiden. Elke metaboliet die in de urine aanwezig is vormt slechts een fractie van de totale aldosteronproductie. Wanneer deze fractie steeds een constant gedeelte zou zijn van de geproduceerde hoeveelheid aldosteron, zou de excretiebepaling van een metaboliet een goede parameter zijn voor die produktie. Zoals later in dit hoofdstuk zal blijken, treedt in sommige gevallen een verandering op in het metabolisme van aldosteron, gevallen waarin een excretiebepaling geen goede informatie geeft omtrent de produktie. Bepaling van de secretiesnelheid - door middel van meting van isotoopdilutie in vivo - verdient in deze gevallen de voorkeur.

In dit hoofdstuk zullen worden besproken de metabolieten van aldosteron die uit urine zijn geïsoleerd. Twee van deze metabolieten komen in aanmerking zowel voor een excretie- als voor een secretiebepaling. Enkele gegevens die voor de keuze van een van deze metabolieten van belang zijn, zullen in het kort worden vermeld. Aangezien in onze studie zowel voor de meting van de excretie- als voor de meting van de secretiesnelheid van aldosteron het 3-oxo-conjugaat wordt gebruikt, zullen we in het kort gegevens over de structuur van dit conjugaat bespreken. Vervolgens zal summier aandacht worden besteed aan de plaats, waar aldosteron wordt omgezet. Tenslotte wordt een overzicht gegeven van de literatuur waarin veranderingen worden beschreven van het aldosteronmetabolisme onder bepaalde omstandigheden.

### § 2. DE METABOLIETEN VAN ALDOSTERON

Kort na de ontdekking van aldosteron kon LUETSCHER, in samenwerking met de groep van WETTSTEIN (LUETSCHER c.s. 1955), aantonen dat de eerder in urine aangetroffen "sodium-retaining factor" (DEMING en LUETSCHER 1950) identiek was aan aldosteron. Eerder hadden VENNING c.s. (1946) waargenomen dat de hoeveelheid extraheerbare corticosteroiden kan worden verhoogd wanneer de urine vóór

extractie op pH 1 wordt gebracht, dit tengevolge van de daarbij optredende hydrolyse van corticosteroidconjugaten. LUETSCHER en medewerkers (AXELRAD c.s. 1955) constateerden dat ook aldosteron in aanzienlijk grotere hoeveelheden kan worden geëxtraheerd, wanneer een zure hydrolyse bij pH 1 wordt uitgevoerd. Uit deze resultaten werd het zeer waarschijnlijk, dat aldosteron voor het overgrote deel in de vorm van een geconjugeerde verbinding in urine aanwezig is. AYRES c.s. (1958) noemden deze verbinding het 3-oxo-conjugaat, aangezien hierin de 3-oxo-groep niet is gereduceerd zoals bij de meeste andere steroidconjugaten.

Pas nadat men beschikte over radioactief gemerkt aldosteron werd meer uitgebreide informatie verkregen omtrent het metabolisme van aldosteron. FLOOD c.s. (1961) deden de volgende waarnemingen. Na een intraveneuze injectie van  $7\text{-}^3\text{H}$ -aldosteron werd binnen 48 uur 92% van de toegediende radioactiviteit in de urine teruggevonden. Van de geïnjecteerde dosis bleek slechts 0,2% als vrij aldosteron te worden geëxcreteerd. Circa 12% van de dosis kon pas uit de urine worden geëxtraheerd (met een oplosmiddel als chloroform) nadat een zure hydrolyse bij pH 1 had plaatsgevonden. Deze 12% bleek voor 60% te bestaan uit het 3-oxo-conjugaat (zonder correctie voor verliezen). Door de urine te behandelen met  $\beta$ -glucuronidase kwam 55% van de toegediende dosis in extraheerbare vorm. Van deze fractie bleek 72% te bestaan uit het zogenaamde tetrahydro-aldosteron-glucuronide, een metaboliet die door ULICK en LIEBERMAN (1957) uit urine was geïsoleerd. (Later werd deze verbinding door ULICK c.s. (1961) chemisch nader geïdentificeerd als het glucuronide van  $3\alpha$ ,  $11\beta$ , 21-trihydroxy- $5\beta$ -pregnaan-20-on-18-al.)

Figuur 2, die ontleend is aan een publikatie van SIEGENTHALER c.s. (1964), toont de secretie van aldosteron, de excretie van vrij aldosteron en de excretie van de tot nu toe besproken metabolieten. Ruwweg kan worden gesteld dat van de geproduceerde hoeveelheid aldosteron (circa  $100\mu\text{g}$ ) 0,1% als vrij aldosteron, 10% als het 3-oxo-conjugaat en 35% als het tetrahydro-aldosteron-glucuronide wordt uitgescheiden.

FLOOD c.s. (1961) hebben later vastgesteld dat het 3-oxo-conjugaat veel sneller wordt uitgescheiden dan het tetrahydro-aldosteron-glucuronide. Binnen 12 uur na een intraveneuze injectie met  $^3\text{H}$ -aldosteron wordt 95% van het daaruit gevormde 3-oxo-conjugaat met de urine uitgescheiden; het tetrahydro-aldosteron-glucuronide is pas na 48 uur voor dit percentage met de urine uitgescheiden. We zullen zien dat dit consequenties heeft voor de meting van de secretiesnelheid van aldosteron.

Naast de besproken metabolieten zijn er nog andere geïdentificeerd. KELLY c.s. (1962a, 1962b, 1963) hebben na toediening van een farmacologische dosis (50 mg gedurende 2 weken) d-aldosteron-21-monoacetaat (gemengd met  $^3\text{H}$ -aldosteron) een

uitgebreide, analytisch-chemische studie verricht naar de metabolieten in de urine. Zo werden aangetoond: dihydro-aldosteron (11 $\beta$ , 21-dihydroxy-5 $\beta$ -pregnaan-3,20-dion-18-al), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro-aldosteron (3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,21-trihydroxy-5 $\alpha$ -pregnaan-20-on-18-al), 3 $\beta$ ,5 $\beta$ -tetrahydro-aldosteron (3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,21-trihydroxy-5 $\beta$ -pregnaan-20-on-18-al), 21-desoxy-tetrahydro-aldosteron (3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-pregnaan-20-on-18-al). Voorts werden door deze groep twee metabolieten geïsoleerd waarin de 11  $\rightarrow$  8 cyclische half-acetaalgroep is omgezet in een 11  $\rightarrow$  18  $\leftarrow$  20 bicyclisch acetaal: het 3 $\alpha$ -hydroxy-pregnaan (11 $\beta$ -18), (18-20)dioxide (M<sub>1</sub> genoemd) en het 3 $\alpha$ ,21-dihydroxy-pregnaan (11 $\beta$ -18)<sub>D</sub> (18-20)dioxide. Al deze verbindingen bleken glucuroniden te zijn. Van deze door KELLY c.s. geïsoleerde verbindingen vertegenwoordigde M<sub>1</sub> 8% van de toegediende dosis, de andere werden in veel kleinere hoeveelheden, circa 1% uitgescheiden (zie ook KELLY en LIEBERMAN, 1964).

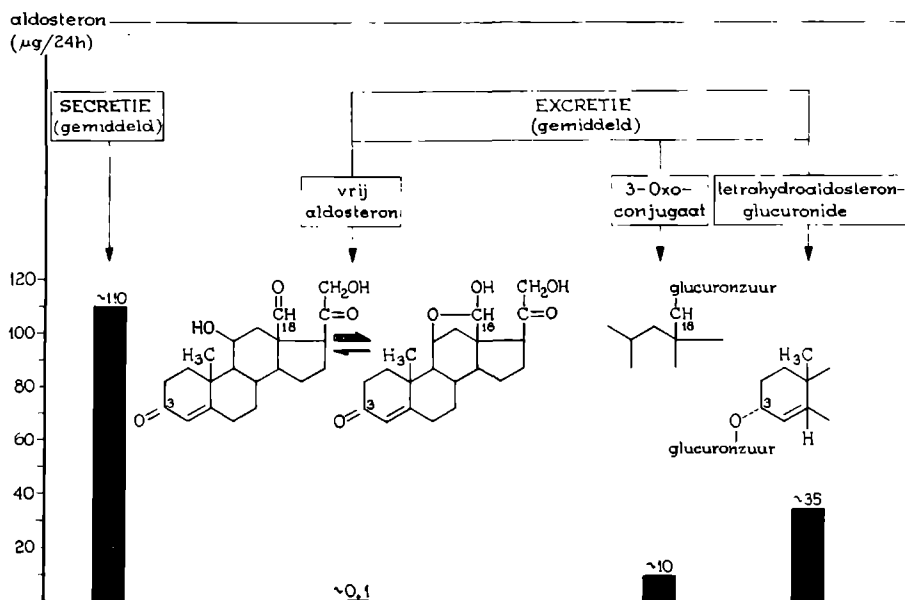


Fig.2. Secretiesnelheid van aldosteron en excretie van vrij aldosteron en enkele metabolieten bij normale volwassenen (gewijzigd naar SIEGENTHALER c.s. 1964)

Tenslotte nog enkele opmerkingen omtrent de beide belangrijkste metabolieten. De meeste onderzoekers kiezen, zowel bij excretie- als bij secretiesnelheidsbepalingen, het 3-oxo-conjugaat als de te meten metaboliet. Een aantal echter prefereren de meting van tetrahydroaldosteron (ULICK c.s. 1958, COPPAGE c.s. 1959, COPE c.s. 1961, PASQUALINI c.s. 1963, CARR en WOTIZ 1963) en wel omdat het tetrahydroaldosteron-glucuronide in ongeveer vier keer zo grote hoeveelheid wordt uitgescheiden als het 3-oxo-conjugaat. De bepaling van het



tetrahydro-aldosteron-glucuronide is minder eenvoudig dan die van het 3-oxo-conjugaat om de volgende vier redenen:

1. Voor beide metaboliëten geldt dat een isolering van het steroïd uit het biologisch milieu moet voorafgaan aan de uiteindelijke meting, aangezien een specifieke reactie voor beide ontbreekt. De isolering van tetrahydro-aldosteron na glucuronidase-hydrolyse is gecompliceerd, omdat bij deze hydrolyse relatief zeer grote hoeveelheden chemisch nauwverwante tetrahydro-metaboliëten van andere corticosteroiden vrijkomen.
2. De detectie van tetrahydro-aldosteron is op papierchromatogrammen moeilijker dan van aldosteron, omdat de U.V.-licht absorberende  $\Delta^4$ -3-oxo-groep ontbreekt.
3. Verliezen, die tijdens de chromatografische zuivering optreden, kunnen gemeten worden wanneer men beschikt over een radioactief gemerkt preparaat van de te bepalen verbinding. Voor de meting van de 3-oxo-conjugaatexcretie is  $^3\text{H}$ -gemerkt aldosteron verkrijgbaar, van tetrahydro-aldosteron is tot op heden geen gemerkt preparaat in de handel.
4. Bijbepaling van de secretiesnelheid van aldosteron door meting van isotoopdilutie in vivo is het een dwingende eis, dat de radioactieve metaboliët nagenoeg volledig wordt uitgescheiden in de verzamelperiode van de urine. Zoals reeds eerder opgemerkt, is de periode waarin dit gebeurt voor tetrahydro-aldosteron-glucuronide veel langer (48 uur) dan voor het 3-oxo-conjugaat (12 uur). Dit impliceert dat met eerstgenoemde metaboliët de secretie slechts kan worden gemeten over 48 uur, hetgeen in de praktijk zeer bezwaarlijk is.

### § 3. DE STRUCTUUR VAN HET 3-OXO-CONJUGAAT

Door recent onderzoek van de groep van TAIT (BOUGAS c.s. 1964, UNDERWOOD en TAIT 1964) en van PASQUALINI (PASQUALINI c.s. 1965) is met redelijke zekerheid aangetoond, dat glucuronzuur een bestanddeel is van het 3-oxo-conjugaat. De plaats van de glycosidische binding in het aldosteronmolecuul is echter nog niet vastgesteld. De belangrijkste gegevens die uit het werk van bovengenoemde onderzoekers zijn verkregen zullen hier vermeld worden.

Het 3-oxo-conjugaat is zeer goed oplosbaar in water en ontleedt vrij snel in zuur milieu door hydrolyse. Deze eigenschappen maken de isolering van deze geconjugeerde verbinding uit urine gecompliceerd. Via solvolyse, kolomchromatografie, papierchromatografie en elektroforese verkregen eerder genoemde onderzoekers enkele milligrammen gezuiverd 3-oxo-conjugaat in handen. Een aantal eigenschappen konden worden bestudeerd. Zo vonden PASQUALINI c.s. (1965) dat de geconjugeerde verbinding bij pH 1 voor 88% wordt gehydrolyseerd. Behande-

ling met  $\beta$ -glucuronidase (bacterieel produkt) gaf een hydrolyse-opbrengst van 7,5%, terwijl behandeling met ketodase ( $\beta$ -glucuronidase preparaat uit lever) 17,5% aldosteron vrijmaakt. Een opmerkelijk resultaat bij dit onderzoek was de hoge hydrolysecapaciteit van een *Helix pomatia* preparaat (spijsverteringssap uit de darm waarin glucuronidasen en sulfatasen voorkomen); het zuivere conjugaat werd hierdoor voor 87% gesplitst. Na zure hydrolyse werd zowel door de groep van TAIT als van PASQUALINI een tweetal stoffen verkregen in de "niet-steroid fractie". Een daarvan gedroeg zich chromatografisch als  $\beta$ -D-glucuronzuur, de tweede als  $\beta$ -D-glucuronolacton ( $\beta$ -D-glucofuranuro-6,3-lacton) (UNDERWOOD en TAIT 1964).

Voor wat betreft de plaats van de glycosidische binding in het aldosteronmolecuul zijn de volgende waarnemingen van belang. Het geïsoleerde conjugaat geeft een positieve blauw-tetrazoliumreactie, waaruit volgens PASQUALINI c.s. zou blijken dat de  $\alpha$ -ketolgroep aan koolstofatoom 17 vrij is. UNDERWOOD en TAIT laten de mogelijkheid open dat koolstofatoom 20 bij de conjugatie betrokken is; het is namelijk niet bekend of de blauw-tetrazoliumreactie daardoor zou worden gestoord. Het 3-oxo-conjugaat reageert op dezelfde wijze met thiosemicarbazide als vrij aldosteron, een reactie waarbij de oxo-groep aan koolstofatoom 3 is betrokken. Hiermede werd bewezen (UNDERWOOD en TAIT 1964) dat bij de glycosidische binding in geen geval koolstofatoom 3 is betrokken. Conjugatie aan koolstofatoom 11 wordt door geen van deze onderzoekers ernstig overwogen, waarschijnlijk omdat de kans bestaat dat ook in het 3-oxo-conjugaat de half-acetaalvorm aanwezig is, waardoor de OH-groep aan koolstofatoom 11 niet meer voor conjugatie beschikbaar is.

Op grond van al deze gegevens besluiten beide groepen van onderzoekers, dat het 3-oxo-conjugaat het 18-glucuronide is van aldosteron. UNDERWOOD en TAIT beklemtonen echter wel dat nader onderzoek het strikte bewijs zal moeten leveren.

#### § 4. PLAATS VAN DE STOFWISSELING VAN ALDOSTERON

Het lijkt thans weinig twijfel dat bij de normale mens de stofwisseling van aldosteron hoofdzakelijk in de lever plaatsvindt. Een krachtig argument hiervoor werd verkregen door de groep van TAIT in experimenten, waarin bij continue infusie van  $^3\text{H}$ -aldosteron de concentraties van  $^3\text{H}$ -aldosteron werden gemeten in perifeer plasma en in veneus leverplasma. Er werd vastgesteld dat nagenoeg al het aldosteron dat de lever binnenkomt door de lever wordt weggevangen. Uit vergelijking van deze leverklaring en de totale metabole klaring door het lichaam kon worden berekend, dat de extrahepatische stofwisseling hoogstens 17% zou kunnen zijn. Dergelijke proefnemingen bij patiënten met ern-

stige hartafwijkingen toonden, dat de stofwisseling van aldosteron in de lever van deze patiënten veel lager is. Zonder verder op deze studies in te gaan zouden we willen wijzen op de mogelijke consequenties van deze veranderingen van de snelheid van het metabolisme op de concentratie van aldosteron in het bloed.

Voor een nadere bespreking van de literatuurgegevens mogen wij verwijzen naar de dissertatie van KLOPPENBORG (1966).

## § 5. VERANDERINGEN VAN HET METABOLISME VAN ALDOSTERON TIJDENS DE ZWANGERSCHAP EN ONDER PATHOLOGISCHE OMSTANDIGHEDEN

Het metabolisme van aldosteron kan veranderen wanneer in de lever de enzymatische reductie van de  $\Delta^4$ -3-oxo-groep en (of) de glucuronidering van aldosteron en zijn metabolieten gestoord zijn. Wanneer de enzymatische reductie ernstiger is geremd dan de glucuronidering, kan worden verwacht dat de omzetting in het 3-oxo-conjugaat toeneemt en de omzetting in tetrahydro-verbindingen afneemt (UNDERWOOD en TAIT 1964). Meting van de excretie van één van deze metabolieten geeft in zulke gevallen een misleidend beeld van de werkelijke productie van aldosteron.

Tijdens de zwangerschap treedt een voortschrijdende stijging op van de aldosteronsecretie en -excretie (VENNING en DYRENFURTH 1956, MARTIN en MILLS 1956, KOCZOREK c.s. 1957, RINSLER en RIGBY 1957, NOWACZYNSKI c.s. 1957, VENNING c.s. 1959, KUMAR c.s. 1959, STARK 1960, WATANABE c.s. 1963). De groep van TAIT (JONES c.s. 1959) vond dat tijdens de laatste maanden van de zwangerschap de uitscheiding van het 3-oxo-conjugaat relatief veel sterker was toegenomen dan die van de tetrahydro-metabolieten. De relatief grotere omzetting in het 3-oxo-conjugaat tijdens de zwangerschap kon worden bevestigd door VENNING c.s. (1959), STARK (1962a, 1962b) en door BOUGAS c.s. (1964), echter niet door WATANABE c.s. (1963). Er moge hier worden opgemerkt, dat door verschillende onderzoekers is waargenomen dat toediening van progesteron, zowel aan mannen als aan vrouwen, de aldosteronproductie sterk deed stijgen (GORNALL 1961, LAIDLAW c.s. 1962, LAYNE c.s. 1962), zonder dat daarbij een verandering optreedt in het metabolietenpatroon van aldosteron in de urine (LAYNE c.s.). LAYNE c.s. zagen bij toediening van zowel oestrogene als ook van een combinatie van oestrogene en progestagene stoffen een verhoging van de aldosteronsecretie. In dit geval echter trad een duidelijke verschuiving op ten gunste van het 3-oxo-conjugaat. De auteurs wezen erop dat tijdens toediening van deze stoffen een verhoging optreedt van de binding van aldosteron aan plasmaproteïnen, en

wel aan de niet-albumine fractie van het plasma, evenals dit in de zwangerschap het geval is (vergelijk MEYER c.s. 1961).

Door HURTER en NABARRO (1960), LUETSCHER c.s. (1962) en KOCZOREK en WOLFF (1959) gerapporteerde waarnemingen suggereren, dat ook bij levercirrose een verschuiving van het metabolisme ten gunste van het 3-oxo-conjugaat optreedt. Door de studie van COPPAGE c.s. (1962) werd dit duidelijk vastgesteld. Terwijl bij normale personen van de ingespoten dosis  $^3\text{H}$ -aldosteron 8,5% werd teruggevonden als 3-oxo-conjugaat en 40,4% als tetrahydro-aldosteron, bedroegen deze waarden bij patiënten met levercirrose 15,8 en 28,9%.

De verhouding 3-oxo-conjugaat: tetrahydro-aldosteron-glucuronide in de urine kan ook veranderen ten gunste van de laatstgenoemde metaboliet. Zo zagen ULICK c.s. (1958) dat bij een patiënt met primair hyperaldosteronisme de uitscheiding van het tetrahydro-aldosteron-glucuronide verhoogd was, terwijl de excretie van het 3-oxo-conjugaat normaal werd bevonden. Eenzelfde waarneming deden PASQUALINI c.s. (1964). Er zijn aanwijzingen dat ook bij hypertensie een gewijzigd aldosteronmetabolisme kan optreden blijkens mondelinge mededelingen van GENEST en LARAGH aan TAIT en TAIT (1962).

In bepaalde gevallen van chronische hypokaliëmie (THERVET c.s. 1965) en kaliumrijk dieet (MILLS 1962) bleek de verhoogde produktie van aldosteron niet gepaard te gaan met een verhoogde excretie van het 3-oxo-conjugaat. LARAGH (1964) heeft er op gewezen dat bij patiënten met een decompensatio cordis of met levercirrose de produktie van aldosteron normaal kan zijn, terwijl de excretie van het 3-oxo-conjugaat sterk verhoogd is.

In alle bovengenoemde gevallen levert de meting van de aldosteron-secretie d.m.v. isotoopverduunning in vivo meer betrouwbare informatie omtrent de produktie van aldosteron dan de meting van de excretie van één van de twee voornaamste metabolieten.

Ook metingen van de secretiesnelheid van aldosteron d.m.v. isotoopverduunning in vivo kunnen onbetrouwbare gegevens verschaffen, wanneer de metaboliet, waaraan de verduunning wordt gemeten, niet volledig is uitgescheiden in de urine die voor de bepaling wordt gebruikt. Bij patiënten met een ernstig gestoorde nierfunctie kan de uitscheidingsnelheid van de metabolieten zodanig verminderd zijn, dat verzameling van de totale hoeveelheid van een radioactief gemerkte metaboliet een ongewenst groot aantal dagen kan vergen. Deze onnauwkeurigheid van de secretiesnelheidsmeting in dergelijke omstandigheden is bestudeerd door COPE en PEARSON (1963) en MULLER (1964). In gevallen waarin zowel excretie- als secretiemetingen minder betrouwbaar zijn, is men aangewezen op de bepaling van aldosteron in bloed (WOLFF en TORBICA 1963, PETERSON 1964, CAMARGO c.s. 1965).

## HOOFDSTUK III

# METHODEN VOOR DE BEPALING VAN ALDOSTERON IN BIOLOGISCHE MEDIA

### § 1. INLEIDING

Na de ontdekking van aldosteron zijn door vele onderzoekers methoden beschreven ter bepaling van dit hormoon in biologische media. Men kan deze onderscheiden in biologische en fysico-chemische methoden naar de aard van de uiteindelijke meting. De biologische methoden worden nauwelijks meer toegepast en komen in dit proefschrift niet nader ter sprake; hiervoor kan verwezen worden naar ROSS (1959), DORFMAN (1962) en TAIT en TAIT (1962).

De fysico-chemische methoden zijn in twee categorieën onder te verdelen: technieken waarbij de uiteindelijke meting spectrofotometrisch of fluorimetrisch geschiedt, en bepalingen waarbij het aldosteron radiometrisch wordt gemeten. Voor de eerstgenoemde methoden geldt dat het aldosteron in vrijwel zuivere vorm uit het biologische medium moet worden afgezonderd, voordat de uiteindelijke reactie wordt uitgevoerd. Deze zuivering is noodzakelijk omdat tot op heden geen enkele redelijk specifieke reactie op aldosteron bekend is. Deze voorwaarde van zuiverheid voor de uiteindelijke meting klemmt nog veel sterker voor de radiometrische methoden, aangezien hierbij de meting op zich geen enkele specificiteit bezit.

Bij de bepaling van aldosteron in urine worden aan de zuiveringsprocedure hoge eisen gesteld. Afgezien van pigmenten, lipoiden en andere storende stoffen is de totaal aanwezige hoeveelheid steroiden meer dan duizend keer die van aldosteron. Voor een overzicht van de in urine voorkomende steroiden zij verwezen naar DORFMAN en UNGAR (1965). Bij de behandeling van bepalingsmethoden van aldosteron en aspecten daarvan, zal in dit hoofdstuk speciaal de bepaling in urine worden besproken.

In § 2 van dit hoofdstuk komen allereerst de bewerkingen aan de orde die noodzakelijk zijn voordat chromatografische scheiding kan worden toegepast (hydrolyse, extractie en voorzuivering). Vervolgens worden in § 3 een aantal modifierende reacties beschreven, die gebruikt zijn om de efficiëntie van de chromatografische scheiding te verhogen. In § 4 wordt aandacht besteed aan de chromatografische procedures, die voor de isolering van aldosteron zijn beschreven.

In § 5 worden in het kort de reacties besproken die voor spectro-

fotometrische en fluorimetrische metingen worden gebruikt.

In § 6 worden de bepalingsmethoden behandeld, waarbij de meting radiometrisch geschiedt. Aangezien in dit proefschrift een radiometrische bepalingsmethode van aldosteron wordt beschreven, is aan deze bepalingsmethoden ruimer aandacht geschonken.

Voor kritische beschouwingen en overzichten van bepalingsmethoden van aldosteron kan worden verwezen naar ROSS (1959), TAIT en TAIT (1962), OERTEL (1962, 1964) en NEHER (1963).

## § 2. NOODZAKELIJKE BEWERKINGEN VÓÓR DE CHROMATOGRAPHISCHE SCHEIDING

### Hydrolyse van het 3-oxo-conjugaat en extractie van aldosteron uit urine

Reeds in het vorige hoofdstuk werd opgemerkt dat onder "bepaling van aldosteron in urine" over het algemeen wordt verstaan: de kwantitatieve bepaling van het door zure hydrolyse uit het 3-oxo-conjugaat vrijgemaakte aldosteron, eventueel tezamen met het vrij in urine voorkomende aldosteron. Vanzelfsprekend kunnen beide componenten afzonderlijk worden bepaald door voor de zure hydrolyse het vrije aldosteron te extraheren; het zeer goed in water oplosbare 3-oxo-conjugaat zal daarbij niet in de organische fase overgaan.

Verskillende onderzoekers (MATTOX en LEWBART 1959, KLIMAN en PETERSON 1960, UNDERWOOD c.s. 1961) hebben een studie gewijd aan de omstandigheden waaronder hydrolyse en extractie het meest gunstig verlopen. Gevarieerd werden:

1. de pH tijdens de hydrolyse
2. de duur van de hydrolyse
3. het contact tussen urine en extractievloeistof
4. wijze van extractie (discontinu of continu)
5. het organisch extractiemiddel

Uit dit onderzoek is gebleken dat de meest eenvoudige werkwijze de meest optimale hydrolyse- en extractieprocedure is; na aanzuren van de urine tot pH 1 wordt deze 24 uur bij kamertemperatuur weggezet, waarna met chloroform of dichloormethaan wordt geëxtraheerd. Wanneer urine één keer met een zevenvoudige hoeveelheid van het extractiemiddel wordt geëxtraheerd, wordt emulsievorming vermeden en wordt een nagenoeg volledige extractie bereikt.

### Vóórzuivering van het extract

Na de extractie wordt de organische laag gewassen met een verdunde loogoplossing, waardoor zure pigmenten worden verwijderd. Het contact met deze alkalische wasvloeistof dient zo kort mogelijk te zijn, aan-

gezien aldosteron zeer snel in dit milieu ontleedt. GARST c.s. (1960) raden aan deze wassing in de koude uit te voeren.

De hoeveelheid pigmenten, fosfolipiden en ander storend materiaal dat bij de extractie in de organische fase overgaat, is van urine tot urine zeer verschillend. Door het wassen met loog wordt hiervan slechts een gedeelte verwijderd. Het zal dan ook veelal noodzakelijk zijn vóór de chromatografische fractionering een verdere voorzuivering toe te passen, aangezien anders de scheiding gemakkelijk wordt verstoord.

Voor verwijdering van ongewenste lipiden kan een vloeistof/vloeistof-partitie worden toegepast. BAULIEU c.s. (1956) passen een verdeling toe tussen water en benzeen, de aldosteronhoudende waterlaag wordt daarna met chloroform geëxtraheerd. NEHER en WETTSTEIN (1955) ontvetten door het urine-extract te verdelen tussen petroleum-ether en ethanol, waaraan een stijgende hoeveelheid water wordt toegevoegd. De waterige alcoholische fase wordt tenslotte met dichloormethaan geëxtraheerd. KLIMAN en PETERSON (1960) verdelen het extract tussen waterige ethanol en cyclohexaan; MOOLENAAR (1957) verdeelt het extract tussen waterige methanol en petroleum-ether-tolueen.

Een andere mogelijkheid tot verwijdering van storend materiaal is het extract met behulp van kolom-adsorptiechromatografie over silicagel te zuiveren. BUSH en SANDBERG (1953) brengen het extract in petroleum-ether-ethylacetaat, 1:1 (v/v) op en elueren de corticosteroiden met methanol-ethylacetaat, 1:1 (v/v), (vergelijk ook AYRES c.s. 1957 en SIEGENTHALER c.s. 1962). NEHER en WETTSTEIN (1955) brengen het extract in methyleenchloride op de kolom en elueren met chloroform-aceton mengsels (vergelijk ook NOWACZINSKY c.s. 1957, STAUB c.s. 1961 en SOBEL c.s. 1959). ROMANI (1958) past een zuivering toe over een florisilkolom, het extract wordt opgebracht in chloroform en geëluëerd met chloroform-ethanol, 8:2 (v/v).

Tenslotte moge genoemd worden de vóorzuiivering van een extract met behulp van monofasische papierchromatografie. Deze methode werd door BUSH (1952) geïntroduceerd; het extract wordt als een streep op een chromatogram gebracht; als mobiele fase dient ethylacetaat-chloroform, 1:1 (v/v). De steroiden lopen met het front, lipiden en pigmenten blijven op de opbrengplaats (vergelijk ook GOWENLOCK 1960 en DYRENFURTH en VENNING 1959).

### § 3. MODIFICERENDE REACTIES ALS MIDDEL TOT VERHOOGING VAN DE EFFICIËNTIE VAN DE CHROMATOGRAPHISCHE SCHEIDING

Detoepassing van modificerende reacties heeft ten doel een verbinding te krijgen met een ten opzichte van de oorspronkelijke verbinding

gewijzigde polariteit. De hieruit resulterende verandering van het chromatografische gedrag kan zeer bijdragen tot een effectieve zuivering (vergelijk ZAFFARONI 1953, NEHER 1963 en BUSH 1961). De volgende reacties zijn belangrijk gebleken voor de bepaling van aldosteron.

#### Vorming van het 18,21-diacetaat van aldosteron

Kwantitatieve vorming van een 18,21-diacetaat uit aldosteron vindt plaats wanneer aldosteron met azijnzuuranhydride en pyridine wordt samengebracht en het mengsel 15 à 24 uur bij kamertemperatuur staat. Deze reactie, waarbij primaire en secundaire alcoholgroepen reageren, werd toegepast bij de eerste pogingen tot isolering van aldosteron (zie hoofdstuk I). De gevormde verbinding is aanmerkelijk minder polair dan het vrije steroïd. Gebruik van radioactief gemerkt azijnzuuranhydride geeft de mogelijkheid tot invoering van twee gemerkte acetaatgroepen in het steroïdmolecuul. PETERSON en EILERS (1965) hebben een uitgebreide studie van deze modificerende reactie gemaakt.

#### Hydrolyse van het 18,21-diacetaat tot het 21-monoacetaat van aldosteron

Door behandeling van het 18,21-diacetaat van aldosteron met verdund zuur kan selectief de acetaatgroep aan koolstofatoom 18 afgesplitst worden. De polariteit van het gevormde 21-monoacetaat ligt tussen die van aldosterondiacetaat en vrij aldosteron in. Deze reactie wordt bij onze methode gebruikt (BENRAAD en KLOPPENBORG 1965).

#### Hydrolyse van het 18,21-diacetaat tot vrij aldosteron

Het vrije aldosteron kan uit het diacetaat worden teruggewonnen door verzeeping met kaliumbicarbonaat in waterige methanol. Ook het 21-monoacetaat gaat bij deze behandeling over in vrij aldosteron (SIMPSON c.s. 1954).

#### Oxydatie van aldosteron tot het $\gamma$ -lacton

Door behandeling met chroomzuur of perjoodzuur wordt aldosteron kwantitatief omgezet in een verbinding waarin het koolstofatoom 21 ontbreekt en het koolstofatoom 18 door één zuurstofatoom is verbonden aan koolstofatoom 20 en via een ander zuurstofatoom is verbonden aan koolstofatoom 11: het z.g.  $\gamma$ -lacton (SIMPSON c.s. 1954). Dit derivaat is een stabiele verbinding, sublimeert gemakkelijk en zou volgens TAIT en TAIT (1962) zeer bruikbaar kunnen zijn voor een gaschromatografische scheiding van aldosteron. MERITS (1962) en KLIMAN en FOSTER (1962) hebben deze derivaatvorming later voor dit doel ook inderdaad gebruikt.



## Oxydatie van het mono- en van het diacetaat van aldosteron

Door oxydatie met chroomzuur wordt aldosteron-21-monoacetaat omgezet in het 11,18-lacton-21-monoacetaat van aldosteron (SIMPSON c.s. 1954, MATTOX c.s. 1956). KLIMAN en PETERSON (1960) hebben aldosterondiacetaat onderworpen aan een chroomzuuroxydatie. Het is zeer waarschijnlijk dat daarbij hetzelfde produkt ontstaat als bij oxydatie van het 21-monoacetaat: het 11,18-keto-lacton. Deze reactie draagt zeer veel bij tot de specificiteit van de aldosteronmeting volgens KLIMAN en PETERSON. Het reactieprodukt is meer polair dan het mono- of diacetaat van aldosteron en heeft diengevolge een chromatografisch gedrag dat sterk verschilt van de uitgangsstof. Een onmiskenbaar nadeel van deze nuttige derivaatvorming is de lage en variabele opbrengst van de reactie.

## Vorming van het benzyldiazon van aldosterondiacetaat

PETERSON (1964) en THERVET c.s. (1965) maken gebruik van een reactie van aldosteron met benzyldiazine, ook weer met het oogmerk een reactieprodukt te verkrijgen met een gewijzigd chromatografisch gedrag vergeleken met de uitgangsstof. PETERSON en EILERS (1965) delen mede dat benzyldiazonen zich niet als een compacte vlek op het papier laten chromatograferen. Iso-nicotinezuur-diazonen zouden in dit opzicht geschikter zijn.

## Vorming van het thiosemicarbazon van aldosteron

Voor zover ons bekend is de vorming van het thiosemicarbazon van aldosteron, die zeer eenvoudig uit te voeren is (UNDERWOOD en TAIT 1964), nog niet gebruikt voor de bepaling van aldosteron. Het met  $^{35}\text{S}$  gemerkte thiosemicarbazide is zeer geschikt voor invoering van een gemerkte groep in een steroïdmolecuul (PETERSON en EILERS 1965). Het lijkt weinig twijfel of deze carbazonvorming zal in de toekomst bij de bepaling van aldosteron een rol gaan spelen (HORTON en TAIT 1965).

## § 4. CHROMATOGRAFIE VAN ALDOSTERON

Zoals reeds eerder opgemerkt is, wordt de specificiteit en daarmee de betrouwbaarheid van een kwantitatieve meting van aldosteron voornamelijk bepaald door de chromatografische zuivering. Reeds bij de eerste onderzoeken ter isolering van aldosteron uit bijnierextract-

ten bleek, dat met een enkelvoudig chromatografisch systeem geen volledige scheiding van de andere corticosteroiden is te bereiken (zie hoofdstuk I). Vaak is herhaalde chromatografie, bij voorkeur gecombineerd met de vorming van een derivaat, noodzakelijk om het aldosteron in zuivere vorm af te zonderen.

In deze paragraaf zal een overzicht gegeven worden van de verschillende chromatografische systemen, waarmee diverse onderzoekers hebben getracht aldosteron te zuiveren. Voor een uitvoerige behandeling van de chromatografie van steroiden kan worden verwezen naar de handboeken van BUSH (1961), ENGEL (1963) en NEHER (1964).

## Papierchromatografie

De papierchromatografische systemen die veelvuldig worden gebruikt voor scheiding van steroiden kunnen, naar de aard van de stationaire fase, worden onderscheiden in systemen van het Bush-type en die van het Zaffaroni-type. In de door BUSH (1952) geïntroduceerde systemen bestaat de stationaire fase uit een mengsel van water en methanol, in de door ZAFFARONI (1951) ontwikkelde systemen uit een niet-vluchtige organische verbinding als propyleenglycol of formamide. Voor beide typen geldt dat de stationaire fase meer polair is dan de mobiele fase. Bij de Bush-systemen wordt de stationaire fase aangebracht door equilibreren met de damp van beide fasen; het papier adsorbeert preferent de meest polaire componenten. Bij de Zaffaroni-systemen wordt het papier geïmpregneerd met de vloeibare stationaire fase.

De door BUSH en ZAFFARONI ontworpen systemen en een aantal modificaties daarvan zijn weergegeven in tabel II. De in deze tabel opgenomen Raldosteron-waarden van de belangrijkste corticosteroiden en een aantal van hun metabolieten geven een indruk omtrent het scheidend vermogen van deze systemen. Voor scheiding van aldosteron van de andere steroiden blijkt het E2B-systeem volgens EBERLEIN en BONGIOVANNI (1955) bijzonder effectief; ook het B5-systeem volgens BUSH (1952) en de Zaffaroni-systemen volgens MATTOX en LEWBART (1959) voldoen in dit opzicht zeer goed. Voor de scheiding van de steroidacetaten hebben KLIMAN en PETERSON (1960) systemen van het Bush-type ontwikkeld. Hiervoor kan ook gebruik gemaakt worden van het E4-systeem van EBERLEIN en BONGIOVANNI (1955) of het F/cybe-systeem volgens NEHER (1964).

Opgemerkt dient te worden dat scheiding van aldosteron van de in tabel II opgenomen steroiden nog geenszins betekent, dat aldosteron op deze wijze gescheiden kan worden van alle, in biologische media aanwezige, steroiden en andere storende stoffen. Het zal in de praktijk blijken dat aldosteron slechts voldoende zuiver wordt verkregen, wanneer verscheidene systemen na elkaar worden toegepast en dan bovendien nog gecombineerd met één of meer modifierende reacties.

Bij bepalingmethoden van aldosteron toegepaste combinaties van chromatografie-systemen zijn opgenomen in tabel III. Het is opmerkelijk dat van jaar tot jaar het aantal chromatografie-systemen bij de bepaling van aldosteron toeneemt. Steeds weer bleek het de onderzoekers dat een ontworpen chromatografische zuivering onvoldoende was; in dit verband kan verwezen worden naar de studies van NOWACKZYNSKI c.s. (1957), SOBEL c.s. (1959) en BROOKS (1960). In een vrij recente publikatie stelt NEHER (1963) dat voor een redelijk specifieke bepaling de invoering van een chemische modificatie (b.v. acetylering) tussen twee of drie papierchromatografie-systemen onmisbaar is.

Enkele praktische gegevens mogen hier volgen betreffende de papierchromatografie. De capaciteit van de Zaffaroni-systemen is aanmerkelijk groter dan die van de Bush-systemen. Voor chromatografische zuivering van ruwe, onzuivere extracten zal over het algemeen een Zaffaroni-systeem dan ook beter geschikt zijn. Hierbij dient evenwel te worden opgemerkt dat verschillende onderzoekers (BUSH 1961, NEHER 1964) de aandacht hebben gevestigd op het feit dat verontreinigingen de loopsnelheden van steroïden in een Zaffaroni-systeem kunnen beïnvloeden. Bovendien is de reproduceerbaarheid van dit soort systemen sterk afhankelijk van een juiste impregnering met de stationaire fase. Een onmiskenbaar nadeel van een Zaffaroni-systeem is ook, dat de eluaten van deze systemen gewoonlijk verontreinigd zijn met de stationaire fase. Men is daarom meestal verplicht deze verontreinigingen door langdurig drogen van het chromatogram te verwijderen of door vloeistof/vloeistof-partitie te elimineren.

Het bezwaar van de Bush-systemen is dat de reproduceerbaarheid nadelig wordt beïnvloed door moeilijk controleerbare variaties in de graad van verzadiging van de chromatografie-tank. De grootte van de "vlek" hangt hiervan af en bepaalt in hoge mate het scheidend vermogen.

Tenslotte verdienen vermelding die papierchromatografische systemen waarin de stationaire fase minder polair is dan de mobiele fase: de z.g. "reversed phase"-systemen. De stationaire fase (paraffine of silicon-olie etc.) wordt aangebracht door impregnatie. In deze systemen hebbende meer polaire steroïden grotere loopsnelheden dan de minder polaire. Deze omkering van loopsnelheid maakt het gebruik van deze systemen naast de normale systemen aantrekkelijk. Nadelen van deze systemen zijn de lange looptijden en de zeer sterke verontreiniging van de eluaten.

## Kolomverdelingschromatografie

Voor kolomverdelingschromatografie kunnen dezelfde combinaties van mobiele en stationaire fase worden gebruikt als voor papierchromatografie. In feite zijn de door BUSH ontwikkelde waterige metha-

T a b e l II

R<sub>aldosteron</sub>-waarden van enkele corticosteroiden in een aantal papierchromatografie-systemen

	Aldo- steron	Corti- sol	Corti- son	Corti- co- steron	Tetra- hydro aldo- steron	Tetra- hydro corti- sol	Tetra- hydro corti- son	Tetra- hydro corti- co- steron	Tetra- hydro- 11-de- hydro- corti- co- steron	Tetra- hydro- 11-des- oxy- corti- sol
	(Ald.)	(F)	(E)	(B)	(TH- Ald.)	(THF)	(THE)	(THB)	(THA)	(THS)
Bush-type										
B1	1,00	0,75	1,25							
B3	1,00**	0,25*	0,40*	0,95*						
B4	1,00	0,75	1,35	3,25	0,70	0,35	0,55	2,65	1,50	1,25
B5	1,00	0,75	1,35	1,95	0,55	0,30	0,65	2,40	2,75	2,00
C	1,00	1,00	1,40	2,00	0,65	0,65	0,90	2,00	1,90	1,80
E2B	1,00	1,40	1,60	2,20	2,20	1,75	2,00	2,50	3,00	4,00
E4	1,00**	1,20*	1,95*	1,95*						
KP-1	1,00	1,00	1,00	1,75	1,00	1,10	1,10			
KP-2	1,00	0,40	1,15	2,70						
KP-3	1,00**	0,40*	0,40*	1,05*						
	0,67*									
Zaffaroni-type										
F/CHCl <sub>3</sub>	1,00	0,40	1,00	1,45	0,35	0,10	0,40	1,00	1,50	1,00
P/Tol	1,00	0,60	1,00	7,20	0,30	0,20	0,30	3,25	>3,60	1,70
E/Tol	1,00	0,70	1,35	7,30	0,35	0,25	0,40	2,70		
F/BW	1,00	2,85	2,75	4,10	1,30	3,10	3,25	4,15	3,70	5,15
E/BW	1,00	2,00	2,05	2,60	0,80	1,60	1,80	2,40	2,30	2,80
F/EBW	1,00	2,45	2,50	3,20	1,15	2,60	2,80			
F/Cy-Be	1,00**	0,25*	0,25*							

\* = het monoacetaat van de verbinding    \*\* = het diacetaat van de verbinding

B1	= toluen - petrol,ether - methanol - water	50 : 50 : 70 : 30	BUSH (1952)
B3	= benzeen - petrol,ether - methanol - water	33 : 17 : 40 : 20	BUSH (1952)
B4	= toluen - methanol - water	100 : 50 : 50	BUSH (1952)
B5	= benzeen - methanol - water	100 : 50 : 50	BUSH (1952)
C	= toluen - ethylacetaat - methanol - water	90 : 10 : 50 : 50	BUSH (1952)
E2B	= isooctaan - tert.butanol - water	100 : 50 : 90	EBERLEIN-BONGIOVANNI (1955)
E4	= isooctaan - tert.butanol - methanol - water	100 : 50 : 50 : 10	EBERLEIN-BONGIOVANNI (1955)
KP-1	= cyclohexaan - dioxaan - methanol - water	40 : 40 : 20 : 10	KLIMAN PETERSON (1960) (gewijzigd)
KP-2	= cyclohexaan - benzeen - methanol - water	50 : 10 : 10 : 40	KLIMAN PETERSON (1960) (gewijzigd)
KP-3	= cyclohexaan - benzeen - methanol - water	60 : 20 : 50 : 10	KLIMAN PETERSON (1960) (gewijzigd)
F/CHCl <sub>3</sub>	= formamide/chloroform		BURTON c.s. (1951)
P/Tol	= propyleenglycol/toluen		BURTON c.s. (1951)
F/BW	= formamide/butylacetaat - water	/100 : 5	MATTOX-LEWBART (1958)
E/BW	= ethyleenglycol/butylacetaat - water	/100 : 5	MATTOX-LEWBART (1958)
F/EBW	= formamide/ethylacetaat - butylacetaat - water	/15 : 85 : 5	NEHER (1963)
F/Cy-Be	= formamide/cyclohexaan - benzeen	/1 : 2	NEHER (1963)

Tabel III

## Bepalingsmethoden van aldosteron

Milieu	Voor- zuiv- ering	Scheidingsprocedure					Meting	Auteur(s)			
		PAPIERCHROMATOGRAPHIE									
Urine	v/v +										
	a.K.	ZP/T	BC				BT,a.Fl.	Neher & Wettstein	1955		
Urine	a.K.	ZF/C	BC				BT,a.Fl.	Neher & Wettstein	1956		
Urine	a.K.	Z	ZF/C				BT,a.Fl.	Neher	1963		
Urine	v/v	B	BB <sub>1</sub>				Dinitr.hydr.	Moolenaar	1957		
Urine	a.K.	ZP/T	B				BT	Roman	1958		
Urine	a.K.	Z	acetyl	Z			BT,a.Fl.	Neher	1963		
Urine	-	Z	acetyl	Z			UV-abs.	Garst	1960		
Urine	a.K.	Z	BE <sub>2</sub> B	BB <sub>5</sub>			UV-abs.,BT	Nowaczynski c.s.	1957		
Urine	a.K.	ZF/C	Z	BC			BT,a.Fl.	Mattox & Lewbart	1959		
Urine	a.K.	Z	BE <sub>2</sub> B	acetyl	BB <sub>3</sub>		a.Fl.	Sobel c.s.	1959		
Urine	a.K.	ZF/C	BC	acetyl	BA		a.Fl.	Brooks	1960		
Urine	v/v	ZP/T	BC	BE <sub>2</sub> B	BB <sub>5</sub>		UV-abs.,BT	Dyrenfurth & Venning	1959		
Urine	-	BC	BE <sub>2</sub> B	hydrazon			UV-abs.	Chen	1959		
Bloed	v/v	BE <sub>2</sub> B	acetyl	BB <sub>3</sub>	BA		BT	Holzbauer & Vogt	1961		
Bloed	-	acetyl	BKP	BKP	BE <sub>4</sub>		dubb.isotoop	Cade & Perenich	1965		
Incubaat	-	acetyl	BKP	BKP	rev.phase		dubb.isotoop	Muller	1965		
Urine	v/v	acetyl	BKP	BKP	oxyd	BKP	dubb.isotoop	Kliman & Peterson	1960		
Bloed	-	pipsyl	rev.phase	ZF/C	oxyd	ZF/C	dubb.isotoop	Bojesen & Degn	1960		
Bloed	a.K.	BB <sub>5</sub>	acetyl	BKP	BKP	BKP	dubb.isotoop	Kodding c.s.	1961		
Bloed	-	B	acetyl	Z	oxyd	Z	dubb.isotoop	Neher	1963		
Urine	v/v	BC	acetyl	BKP	BKP	oxyd	BKP	dubb.isotoop	Kliman	1963	
Incubaat	-	acetyl	B	BB <sub>3</sub>	oxyd	B	dubb.isotoop	Stachenko c.s.	1964		
Urine	v/v	BKP	acetyl	BKP	BKP	oxyd	BKP	dubb.isotoop	Schwarz & Bloch	1964	
Bloed	v/v	BB <sub>5</sub>	acetyl	BKP	BKP	rev.phase	hydrazon	dubb.isotoop	Peterson	1964	
Urine	v/v	BC	BB <sub>5</sub>	acetyl	BKP	BKP	oxyd	BE <sub>4</sub> BKP	dubb.isotoop	Kowarski c.s.	1964
KOLOM- EN PAPIERCHROMATOGRAPHIE											
Urine	a.K.	v.K.	acetyl	v.K.	BB <sub>3</sub>		a.Fl.	Ayres c.s.	1957		
Incubaat	a.K.	v.K.	v.K.	v.K.	BB <sub>3</sub>		a.Fl.	Ayres c.s.	1960		
Urine	a.K.	v.K.	acetyl	BB <sub>3</sub>			a.Fl.	Flood c.s.	1961		
Urine	a.K.	v.K.	v.K.	acetyl	v.K.		a.Fl.	Siegenthaler c.s.	1962		
Urine	-	ZP/T	acetyl	Z	v.K.		dubb.isotoop	Laragh	1965		

Urine	a.K.	D.L.C.							BT	Nishikaze & Staudinger	1962
		2 dim.									
Urine	a.K.	D.L.C.	D.L.C.						BT	Audrin c.s.	1963
		2 dim.									
Urine	v/v	D.L.C.	acetyl	D.L.C.	D.L.C.				z.Fl.	Gerdes & Staib	1965a
Urine	v/v	D.L.C.	acetyl	D.L.C.	D.L.C.	BKP	D.L.C.	(hydrol. D.L.C.)	dubb.isotoop	Benraad & Kloppenborg	1965
					2 dim.						

*BA, BB<sub>1</sub>, BB<sub>3</sub>, BB<sub>5</sub>, BC* = papierchromatografie-systemen volgens Bush (1952)  
*RE<sub>2</sub>B, BE<sub>4</sub>* = papierchromatografie-systemen v.h.Bush-type, Eberlein en Bongiovanni (1955)  
*BKP* = papierchromatografie-systemen v.h.Bush-type, Kliman en Peterson (1960)  
*B* = papierchromatografie-systemen v.h.Bush-type, de diverse auteurs  
*ZP/T, ZF/C* = papierchromatografie-systemen volgens Zaffaroni c.s. (1950)  
*Z* = papierchromatografie-systemen v.h.Zaffaroni-type, de diverse auteurs  
*D.L.C.* = dunnelaagchromatografie

2 dim. = twee dimensionaal  
 v/v = vloeistof/vloeistof-partitie  
 a.K. = adsorptiekolom  
 v.K. = verdelingskolom  
 BT = blauw-tetrazolium reactie  
 a.Fl. = fluorescentie in alkalisch milieu  
       = alkalische fluorescentie  
 z.Fl. = fluorescentie in zuur milieu  
       = zure fluorescentie  
 dinitr.hydr. = dinitrofenylhydrazine reactie  
  
 hydrol = hydrolyse van aldosterondiacetaat tot het monoacetaat  
 oxyd = oxydatie met chroomtrioxyde  
 hydrazon = reactie met hydrazine  
 pipsyl = "pipsylering" met behulp van <sup>131</sup>I-p. joodbenzeen-sulfonzuuranhydride  
 acetyl = acetylering met behulp van azijnzuur-anhydride  
 rev.phase = reversed phase

T a b e l IV

Raldosteron-waarden van enkele corticosteroiden in een aantal dunnelaagchromatografie-systemen

Auteur(s)		Aldo- steron	Corti- sol	Corti- son	Corti- co- steron	Tetra- hydro aldo- steron	Tetra- hydro corti- sol	Tetra- hydro corti- son	Tetra- hydro corti- co- steron	Tetra- hydro- 11-de- hydro- corti- co- steron	Tetra- hydro- 11-des- oxy- corti- sol
		(Ald.)	(F)	(E)	(B)	(TH- Ald.)	(THF)	(THE)	(THB)	(THA)	(THS)
Lisboa (1963)	A	1,00	2,40	2,40	1,70						
	B	1,00	0,70	1,35	1,35						
	C	1,00	1,70	1,70	1,40						
	D	1,00	1,00	1,30	1,25						
	E	1,00	0,70	1,00	1,05		0,35	0,50			0,80
McCarthy c.s. (1964)		1,00	0,50	0,90	1,15						
Bennett en Heftmann (1962)	A	1,00	0,75	1,25	1,50						
	B	1,00	2,00	2,60	1,70						
Quesenberry en Ungar (1964)	A	1,00	0,65	1,20	1,50		0,45	0,55	1,00	1,15	
	B	1,00	2,25	2,80	2,35		2,90	2,20	2,00	1,30	
	C	1,00	0,75	1,30	1,50		0,44	0,50	1,00	1,30	
	D	1,00	1,30	1,40	1,45						
Cavina-Vicari (1964)	A	1,00	0,80	1,20	1,20		0,40	0,60	0,85	0,95	0,95
	B	1,00	0,60	1,20	1,40		0,25	0,45	0,75	1,00	0,70
	C	1,00	2,14	2,85	2,85		1,55	1,70	2,85	1,15	4,85
Chromatogram I Eigen methode		1,00	1,49	1,76	1,66	0,77	1,22	1,20	1,24	1,24	1,34



Lisboa	A cyclohexaan - ethylacetaat - ethanol	45	:	45	:	10
	B chloroform - ethanol	90	:	10	:	
	C ethylacetaat - n.hexaan - ethanol - azijnzuur	72	:	13,5	:	4,5 : 10
	D benzeen - ethanol	40	:	10	:	
	E benzeen - ethanol	90	:	10	:	
McCarthy c.s.	chloroform - ethanol - water	92	:	8	:	0,5
Bennett & Heftmann	A chloroform - methanol - water	188	:	12	:	1
	B ethylacetaat - chloroform - water	90	:	10	:	1
Quesenberry & Ungar	A dichloormethaan - methanol - water	150	:	9	:	0,5
	B chloroform - ethylacetaat	1	:	50	:	
	C dichloormethaan - methanol - water - glycerol	150	:	10	:	1 : 0,4
	D benzeen - aceton - water	75	:	50	:	0,2
Cavina & Vicari	A chloroform - ethanol	90	:	10	:	
	B chloroform - methanol - water	90	:	9	:	1
	C cyclohexaan - ethylacetaat	50	:	50	:	

nol-systemen afgeleid van de verdelingskolommen die door MORRIS c.s. (1950) zijn gebruikt voor scheiding van steroïden. De onderzoekers, die van kolomverdelingschromatografie gebruik maken (zie tabel III), verstrekken in het algemeen weinig gegevens over het scheidend vermogen van de kolommen. Zelden vindt men in de literatuur retentievolumina aangegeven van een aantal steroïden (TAIT en TAIT 1960). Een onmiskenbaar nadeel van kolomchromatografie ten opzichte van papier- en dunnelaagchromatografie is het feit dat de detectie van de gescheiden steroïden veel minder eenvoudig is.

### Dunnelaagchromatografie

Dunnelaagchromatografie is in de laatste jaren veelvuldig toegepast bij zuivering en scheiding van steroïden. Aanvankelijk werden slechts mengsels van zuivere steroïden geanalyseerd; voor wat corticosteroiden betreft moge hier verwezen worden naar het werk van HERMANEK c.s. (1961), STARKA en MALIKOVA (1961), CERNY c.s. (1961), SMITH en FOELL (1962), VAEDTKE en GAJEWSKA (1962), MATIS c.s. (1962), BENNETT en HEFTMANN (1962), BRUINVELS (1963), LISBOA (1963, 1964), FREIMUTH c.s. (1964). Meer recent werd ook het gebruik van dunnelaagchromatografie beschreven bij kwalitatieve en kwantitatieve bepalingen van corticosteroiden in biologische media (ADAMEC c.s. 1963, NISHIKAZE c.s. 1963, QUESENBERRY en UNGAR 1964, GERDES en STAIB 1965a, FEHER 1965).

In de literatuur treft men slechts enkele publikaties aan, waarin dunnelaagchromatografie wordt toegepast bij de bepaling van aldosteron in biologische media (AUDRIN c.s. 1963, NISHIKAZE en STAUDINGER 1962, BENRAAD en KLOPPENBORG 1964, 1965, GERDES en STAIB 1965b). Een overzicht is opgenomen in tabel III.

De praktische uitvoering en toepassingen van de dunnelaagchromatografie worden uitvoerig beschreven in de boeken van STAHL (1962), RANDERATH (1962), BOBBITT (1963) en NEHER (1964), en in de overzichtsartikelen van DEMOLE (1961), MANGOLD (1961) en DEVIS (1965).

Enkele gegevens over dunnelaagchromatografie, speciaal wat betreft corticosteroiden, worden hier nog vermeld.

### Scheidend vermogen

In tabel IV worden een aantal systemen vermeld met de daarbij behorende Raldosteron-waarden van een aantal corticosteroiden en hun metabolieten. Bij vergelijking van deze waarden en die van tabel II blijkt, dat het scheidend vermogen van een aantal dunnelaagchromatografie-systemen minstens even groot is als dat van het E2B-systeem, waarvan mag worden gezegd, dat het voor aldosteron het meest effectief scheidende papierchromatografische systeem is.

## Ontwikkeltijd

De ontwikkeltijd is voor een dunnelaagchromatografie circa 30 minuten; voor papierchromatografische systemen varieert deze van 3 tot 72 uur, waarbij vaak nog een equilibratietijd van 3 tot 12 uur moet worden gerekend.

## Eenvoudige uitvoerbaarheid

Omdat bij adsorptiechromatografie op silicagel geen stationaire fase behoeft te worden aangebracht, is dunnelaagchromatografie eenvoudiger in de praktische uitvoering dan papierchromatografie en wel gezien de volgende punten:

1. er behoeft niet gezorgd te worden voor een constante temperatuur
2. er behoeft minder zorg besteed te worden aan verzadiging van de tank
3. equilibratie is niet nodig
4. het eluaat is niet verontreinigd met de stationaire fase
5. de hoeveelheid extract, die kan worden opgebracht met behoud van een goede scheiding, is bij dunnelaagchromatografie veelal groter dan bij papierchromatografie.

## Ontleding van steroïden tijdens dunnelaagchromatografie

Onderzoek van MATTOX en MASON (1956) toonde aan dat de  $\alpha$ -ketogroep van steroïden wordt geoxydeerd wanneer deze steroïden langdurig (5 dagen) in contact zijn met een mengsel van silicagel en formamide. Helaas zijn deze onderzoekers niet nagegaan of ook bij een kort durend contact met silicagel alleen een ontleding optrad. NEHER (1964) signaleert het gevaar voor ontleding van steroïden als aldosteron bij gebruik van dunnelaagchromatografie, zonder daarbij experimentele gegevens te vermelden.

Eigen waarnemingen aangaande ontleding van aldosteron tijdens dunnelaagchromatografie zullen worden besproken in hoofdstuk V. We zouden hier slechts willen opmerken dat door een contact van aldosteron met silicagel gedurende enkele uren geen ontleding van enige betekenis optreedt; echter wanneer aldosteron na de chromatografie gedurende meerdere dagen op het chromatogram aanwezig blijft, treedt een aanzienlijke ontleding op.

## § 5. METING VAN ALDOSTERON MET BEHULP VAN SPECTROFOTOMETRISCHE EN FLUORIMETRISCHE REACTIES

De U.V.-absorptie van aldosteron en de verschillende kleur- en fluo-

rescentiereacties, die bij de uiteindelijke meting na de chromatografische zuivering zijn gebruikt, zullen in het kort worden besproken. Bepalingsmethoden, waarbij deze reacties worden gebruikt, raken langzamerhand in discrediet, waarbij wellicht een uitzondering gemaakt moet worden voor de methoden, waarbij met behulp van de alkalische fluorescentiereactie wordt gemeten.

Wegens de hoge blancowaarden is de gevoeligheid van vele van deze reacties onvoldoende (2-3  $\mu$ g). Voor de bepaling van aldosteron in urine is echter een gevoeligheid van de uiteindelijke meting vereist van circa 0,5  $\mu$ g. Bovendien geeft het gebruik van deze reacties niet de mogelijkheid de specificiteit van elke bepaling afzonderlijk te controleren.

#### a. Ultraviolet-absorptie

Het U.V.-absorptiespectrum van steroïden met een  $\Delta^4$ -3-oxogroep vertoont een maximum bij 240 m $\mu$ . Deze U.V.-absorptie wordt nog maar zelden gebruikt voor de meting van aldosteron (vergelijk GARST 1960). Vanwege de hoge blancowaarden van papiereluatens ligt de onderste gevoeligheidsgrens bij omstreeks 3  $\mu$ g.

De U.V.-absorptie wordt veel toegepast voor detectie van  $\Delta^4$ -3-oxosteroïden op papier- en dunnelaagchromatogrammen.

#### b. Fluorescentie in alkalisch milieu

In alkalisch milieu vormt zich uit een steroïd met een  $\Delta^4$ -3-oxogroep een produkt, dat onder anhydriche omstandigheden geel fluoresceert bij bestraling met U.V.-licht. De reactie is direct op het papierchromatogram uit te voeren. De intensiteit van de fluorescentie van de aldosteronvlek op het papierchromatogram kan geschat worden (NEHER en WETTSTEIN 1955, BAULIEU c.s. 1956, REICH 1958, MATTOX en LEWBART 1959) of met een speciaal geconstrueerde fluorimeter gemeten worden (AYRES c.s. 1957, SINGER 1960, BARTTER c.s. 1960, SOBEL c.s. 1959, BROOKS 1960, FLOOD c.s. 1961).

De reactie met alkali kan ook uitgevoerd worden op het eluaat van de aldosteronvlek. STAUB c.s. (1961) passen dit toe gebruik makend van het door ABELSON en BONDY (1955) geïntroduceerde tertiair kaliumbutoxide-reagens.

De methoden, waarbij de fluorescentie wordt geschat, dienen als semi-kwantitatief te worden beschouwd. Wordt de fluorescentie van de vlek gemeten met een fluorimeter, dan kan men van 0,5  $\mu$ g aldosteron een fluorescentie verwachten die tweemaal zo hoog is als van de blanco (AYRES c.s. 1957). Aan de directe meting op papier is het bezwaar verbonden, dat een homogene bevochtiging met het reagens noodzakelijk is, evenals een gelijkmatige en reproduceerbare droging (NEHER 1960).

Voor een studie betreffende directe kwantitatieve meting van fluores-

centie van een vlek op een papierchromatogram kan verwezen worden naar GOWENLOCK (1960).

Dedoor NOWOTNY c.s. (1965) beschreven fluorimetrische microbepaling van  $\Delta^4$ -3-oxo-steroiden - op een lithiumhydroxyde-tablet - is door hen nog slechts toegepast op zuivere steroiden.

### c. Formazan vorming

Steroiden met een  $\alpha$ -ketol-zijketen aan koolstofatoom 17 reageren met tetrazoliumblauw (3,3'-dianisol-bis-4,4'-(3,5-difeny)tetrazolium-chloride) onder vorming van een blauw gekleurd formazan (MADER en BUCK 1952).

Een aantal onderzoekers hebben deze reactie gecombineerd met de reactie beschreven onder b. Het chromatogram wordt dan bespoten met een verdunde loogoplossing waarin het tetrazoliumzout is opgelost. De ontstane blauwe vlekken die onder U.V.-belichting geel fluoresceren, kunnen vergeleken worden met vlekken van bekende hoeveelheden aldosteron (o.a. NEHER en WETTSTEIN 1955). De tetrazoliumreactie kan ook op het eluaat van een vlek worden uitgevoerd. Ook hier is de blanco-waarde van de papiereneluatens bepalend voor de onderste gevoeligheids-grens die ongeveer  $3\mu\text{g}$  bedraagt (NOWACZYNSKI c.s. 1955).

### d. Reactie met 2,4-dinitrofenylhydrazine

Alle steroiden met een  $\Delta^4$ -3-oxo-groep reageren bij kamertemperatuur met 2,4-dinitrofenylhydrazine onder vorming van een hydrazon. Wanneer de temperatuur tijdens de reactie wordt verhoogd tot  $90^\circ\text{C}$ , reageert ook de 20-oxo-groep en mogelijk de 18-aldehyde-groep.

MOOLENAAR heeft reeds in 1957 een aldosteronbepaling ontwikkeld gebaseerd op deze hydrazonvorming. De omstandigheden tijdens de reactie werden zo gekozen, dat het absorptiemaximum voor aldosteron (bij  $460\text{ m}\mu$ ) enigszins verschilde met dat van cortison en cortisol (bij  $480\text{ m}\mu$ ). Door coprecipitatie met benzoëzuur en uitwassen van het precipitaat werd de blanco van de bepaling verlaagd, doch ondanks deze zuivering werd een correctie nodig geacht voor de "achtergrond-kleur". De auteur verstrekke gegevens over de gevoeligheid van de reactie.

### e. Reactie met fenylhydrazine na oxydatie van de $\alpha$ -ketol-zijketen

MATTOX en LEWBART (1959) namen waar dat de  $\alpha$ -ketol-zijketen in aanwezigheid van koper-ionen en zuurstof omgezet wordt tot de 20-keto-21-aldehyde-groep. Deze laatste groepering reageert met het Porter-Silber-reagens (fenylhydrazine-zwavelzuur-reagens) onder vorming van een gekleurde verbinding met een absorptiemaximum bij  $410\text{ m}\mu$ .

Deze reactie is ongetwijfeld meer specifiek dan een van de hiervoor besproken reacties. De reproduceerbaarheid van deze reactie is laag; de gevoeligheid zou volgens de auteurs circa  $0,5\mu\text{g}$  zijn. De blanco-waarde van het papier bedraagt:  $0,3\mu\text{g}$ .

#### f. Fluorescentie in zwavelzuur-milieu

Deze reactie is o.a. door BRUINVELS (1965) bestudeerd en bij de bepaling van aldosteron in urine toegepast door GERDES en STAIB (1965b). Uit de gegevens van BRUINVELS blijkt dat deze reactie

- (i) "van dag tot dag verschillend uitvalt", m.a.w. slecht reproduceerbaar is
- (ii) een gevoeligheid heeft met een onderste grens van  $2\mu\text{g}$
- (iii) zo aspecifiek is, dat ze niet kan worden uitgevoerd op een eluaat van een papierchromatogram.

### § 6. METING VAN ALDOSTERON MET BEHULP VAN ISOTOPEN

Door een te analyseren verbinding in reactie te brengen met een radioactief gemerkt reagens kan een radioactief gemerkt derivaat worden gevormd. Wanneer de specifieke activiteit van het reagens en de reactievergelijking bekend zijn, kan na zuivering van het gevormde derivaat van alle aspecifieke radioactiviteit de gewichtshoeveelheid worden afgeleid uit meting van de radioactiviteit. De specificiteit van dergelijke metingen hangt nagenoeg volledig af van de toegepaste zuiveringsprocedures. Deze zuivering gaat over het algemeen met grote verliezen gepaard; vandaar dat een meting hiervan niet achterwege mag blijven. De meting van deze verliezen is mogelijk door gebruik te maken van een radioactief gemerkte "verliesindicator", het tweede isotoop. Voor deze dubbel-isotoop methoden is het noodzakelijk dat de energiespectra van de twee isotopen dusdanig verschillen, dat meting van elk afzonderlijk mogelijk is. De gevoeligheid van dergelijke radiometrische methoden is in principe bijzonder groot; ze zijn dan ook op verschillende terreinen van de biochemie toegepast.

KESTON c.s. (1947) pasten voor het eerst de dubbel-isotoop methode toe voor de kwantitatieve bepaling van aminozuren. Zij gebruikten als radioactief reagens  $^{131}\text{J}$ -p-joodbenzeensulfonylchloride ( $^{131}\text{J}$ -pipsylchloride), waarmee aminozuren reageren onder vorming van een met  $^{131}\text{J}$  gemerkt sulfonamide. Na beëindiging van deze reactie werd als "verliesindicator" een bekende hoeveelheid van een  $^{35}\text{S}$ -pipsyl-derivaat van het aminozuur toegevoegd. Na eliminering van alle aspecifieke  $^{131}\text{J}$ -radioactiviteit kon uit de  $^{131}\text{J}$ -activiteit de hoeveelheid van het aminozuur worden berekend. Uit de  $^{35}\text{S}$ -activiteit konden de verliezen, die waren opgetreden na de derivaatvorming, worden vastge-

steld. Een dergelijke dubbel-isotoop methode wordt wel "*double isotope derivative assay*" genoemd (KLIMAN en PETERSON 1960).

Gunstiger is het, wanneer van de te analyseren verbinding een radioactief gemerkt preparaat voor handen is; immers dan kan deze als "verliesindicator" dienst doen. Zo werd door KESTON en LOSPALLUTO (1951) een bekende hoeveelheid van het met  $^{14}\text{C}$  gemerkte aminozuur aan het te analyseren monster toegevoegd; na reactie met het  $^{131}\text{J}$ -pipsylchloride en zuivering werd de  $^{131}\text{J}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit gemeten. Bij een dergelijke methode behoeft de derivaatvorming niet kwantitatief te verlopen en kan voor alle verliezen, die tijdens de analysegang optreden, worden gecorrigeerd. Een dergelijke dubbel-isotoop methode wordt wel "*double isotope dilution derivative assay*" genoemd (KLIMAN en PETERSON 1960).

Het gebruik van radioactieve pipsylreagentia ter bepaling van steroidhormonen werd door BOJESSEN, KESTON en CARSOTIS (1953) geïntroduceerd. Met behulp van dergelijke reagentia is door BOJESSEN en DEGN (1960) een bepaling van aldosteron ontwikkeld. Buiten het laboratorium van BOJESSEN heeft deze bepaling nauwelijks toepassing gevonden; aan het gebruik van  $^{131}\text{J}$ -pipsylchloride kleefte nl. het bezwaar van de korte halveringstijd van het  $^{131}\text{J}$ -isotoop (8 dagen).

In hoofdstuk I werd reeds besproken dat SIMPSON en TAIT in 1953 opmerkten, dat de reactie van aldosteron met radioactief gemerkt azijnzuuranhydride de basis zou kunnen vormen voor een zeer gevoelige bepaling. Medewerkers van TAIT rapporteerden in 1954 hun pogingen om met behulp van een "double isotope derivative assay" aldosteron in perifeer bloed te bepalen (AVIVI c.s. 1954). Na kolomchromatografische zuivering van een bloedextract werd met  $^3\text{H}$ -azijnzuuranhydride geacetylerd, aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat werd als indicator toegevoegd, en het mengsel werd gezuiverd met behulp van herhaalde kolomchromatografie. De zuivering leidde niet tot het gewenste resultaat, daar het aldosteron- $^{14}\text{C}$ - $^3\text{H}$ -diacetaat verontreinigd bleef met specifieke  $^3\text{H}$ -radioactiviteit. (Overigens was de specifieke activiteit van het gebruikte  $^3\text{H}$ -azijnzuuranhydride (7,9 mC/mmol) veel te laag voor meting van de lage aldosteronconcentratie in perifeer bloed).

De eerste succesvolle "double isotope derivative assay" van aldosteron (in urine en bijniervene-bloed) met behulp van  $^3\text{H}$ -azijnzuuranhydride als reagens werd beschreven door KLIMAN en PETERSON (1958). Het extract van urine of bloed werd geacetylerd met  $^3\text{H}$ -azijnzuuranhydride, waarna aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat werd toegevoegd. De zuivering werd uitgevoerd met behulp van herhaalde papierchromatografie in combinatie met een chroomtrioxyde-oxydatie. In de beschrijving van deze methode (KLIMAN en PETERSON 1960) wordt eveneens melding gemaakt van enkele metingen van aldosteron met behulp van een "double isotope dilution derivative assay". In deze laatste methode gebruikten de onderzoekers  $^3\text{H}$ -gemerkt aldosteron als indicator en  $^{14}\text{C}$ -

gemerkt azijnzuuranhydride als reagens.

Aangezien alle radiometrische aldosteronbepalingen nadien op deze methodiek gebaseerd zijn, zullen enkele algemene aspecten van deze dubbel-isotoop methode worden besproken.

### Specificiteit

De uiteindelijke kwantitatieve meting, bestaande uit een meting van  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit, waarborgt geen enkele specificiteit. Alle met  $^{14}\text{C}$  gemerkte verbindingen moeten worden verwijderd, hetgeen door een effectieve chromatografische zuivering kan worden bereikt. Een gunstig aspect van het gebruik van twee isotopen is nu, dat het verloop van de zuivering kan worden gecontroleerd door de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding te bepalen na elke stap van de zuiveringsprocedure. Blijft deze verhouding ondanks voortgezette chromatografie constant, dan geeft dit een redelijke zekerheid dat het geïsoleerde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat zuiver is. Zoals reeds eerder is opgemerkt, wordt in de methode van Kliman en Peterson een chroomtrioxyde-oxydatie toegepast, een noodzakelijke stap voor het verkrijgen van een constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding.

Een nadere controle op zuiverheid kan worden uitgevoerd door de verdeling van radioactiviteit op het papierchromatogram vast te stellen ("scannen"); een scherpe piek van radioactiviteit op de plaats van het aldosteronderivaat, zonder waarneembare activiteit aan weerszijden, is een indicatie voor zuiverheid.

Een zeer betrouwbare en elegante manier voor het vaststellen van de specificiteit van de bepaling is de meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding voor en na hydrolyse van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat tot  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat met daarop volgende chromatografie van het monoacetaat. Het afsplitsen van een van beide  $^{14}\text{C}$ -acetaatgroepen moet leiden tot verdubbeling van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding.

Verschillende onderzoekers (KLIMAN en PETERSON 1960, COPE 1964, KESTON c.s. 1947) hanteren nog een ander criterium voor controle van de specificiteit. De  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding in verschillende, opeenvolgende delen van een chromatografische "piek" geeft volgens hen een indruk omtrent de homogeniteit van deze piek. Waarnemingen betreffende isotoopfractionering hebben aangetoond, dat dit criterium zeker niet in alle gevallen juist is. In hoofdstuk V wordt dit aspect uitvoerig besproken.

Naast de chemische toetsing van de specificiteit kan deze ook langs biochemische weg worden benaderd. De bepaling van aldosteron in lichaamsvloeistoffen van bijnierloze patiënten mag bijvoorbeeld niet ver afwijken van een blancobepaling.



## Gevoeligheid van de dubbel-isotoop methode

De specifieke activiteit van het azijnzuuranhydride, de "overall recovery" en de blancowaarden van de bepaling begrenzen de gevoeligheid van deze methode. Zonder hier op dit aspect nader in te gaan (zie daarvoor hoofdstuk V) moge vermeld worden, dat bij gebruik van  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride met een specifieke activiteit van 100 mC/mmol een hoeveelheid van circa 0,5 nanogram aldosteron kan worden bepaald. De dubbel-isotoop methode is tot dusver dan ook de enige methode, waarmee de zeer lage aldosteronconcentratie in perifeer bloed kan worden bepaald (PETERSON 1964).

## Nauwkeurigheid van de dubbel-isotoop methode

De bepaling van de specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride is maatgevend voor de nauwkeurigheid van de aldosteronbepaling. Bovendien hangt deze nauwkeurigheid samen met de aanwezige hoeveelheid aldosteron en met de uiteindelijke  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding. Ook dit aspect zal in hoofdstuk V nader worden besproken.

## Nadere ontwikkelingen in de dubbel-isotoop methode ter bepaling van aldosteron

Een aantal onderzoekers gebruiken de methode van Kliman en Peterson in gewijzigde vorm (tabel III). Sommigen hebben bij de meting in bloed of incubatiemedia de methode vereenvoudigd door weglating van de chroomtrioxyde-oxydatie (CADE en PERENICH 1965, MÜLLER 1965). Anderen hebben deze oxydatie vervangen door aanvullende chromatografie zowel vóór als ná de acetylering (KÖDDING c.s. 1961, KLIMAN 1963, STACHENKO c.s. 1964, SCHWARZ en BLOCH 1964). NEHER (1963) heeft in plaats van Bush-systemen, systemen van het Zaffaroni-type gebruikt en deze ook duidelijk verantwoord. De meest uitgebreide bepalingen zeer waarschijnlijk ook de meest specifieke is die volgens PETERSON (1964), ontwikkeld voor de bepaling van aldosteron in perifeer bloed. In deze methode wordt de chroomtrioxyde-oxydatie vervangen door een hydrazonvorming, gecombineerd met een "reversed phase"-systeem. KOWARSKI c.s. (1964) hebben de methode van Kliman en Peterson op specificiteit getest door aan een geadrenalectomeerde patiënt aldosteron toe te dienen en de specifieke activiteit van het mengsel en van het uitgescheiden 3-oxo-conjugaat te bepalen. Hierbij bleek dat geen enkele zuiveringsstap uit de methode kan worden weggelaten. In tabel III zijn ook de dubbel-isotoop methoden volgens THERVET c.s. (1965) en die volgens LARAGH c.s. (1965) opgenomen, methoden waarbij kolomchromatografie wordt gebruikt.

Tenslotte moge genoemd worden een recente studie van KLIMAN (1965), waarin ter bepaling van aldosteron in urine de dubbel-isotoop methode wordt gecombineerd met gaschromatografie. Wanneer na een zuivering met behulp van een tweetal papierchromatogrammen en een dunnelaagchromatogram een gaschromatografische analyse wordt toegepast, is nog geen rechtlijnige correlatie aanwezig tussen piekhoogte en hoeveelheid aldosteron. KLIMAN is er dan ook toe over gegaan de dubbel-isotoop methode te combineren met gaschromatografie. Na zuivering van het dubbelgemerkte aldosterondiacetaat wordt een gaschromatografische analyse uitgevoerd. Het gas, dat de "pick" veroorzaakt, wordt opgevangen op een scintillatie-kristal, waarna  $^{14}\text{C}$  en  $^3\text{H}$  worden gemeten. De bijzonder gecompliceerde methode heeft boven de oorspronkelijke methode van Kliman en Peterson geen enkel ander voordeel dan dat de duur van de analyse 4 dagen bedraagt in plaats van 6.

Aangezien de gaschromatografische bepaling van aldosteron (vergeleijk GOTTFRIED 1965) zich nog in een zeer vroeg experimenteel stadium bevindt, volstaan we met KLIMAN (1965, in discussie) te citeren: "For aldosterone the problems produced by gaschromatography probably equal the problems that are solved by gasliquidchromatography".

## HOOFDSTUK IV

### BESCHRIJVING VAN DE EIGEN METHODE

#### § 1. INLEIDING

Bij de ontwikkeling van de in dit hoofdstuk beschreven bepaling van het 3-oxo-conjugaat van aldosteron in urine werd uitgegaan van de eerder genoemde "double isotope dilution derivative" methode volgens KLIMAN en PETERSON (1960). De methode berust op gebruik van  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride als reagens en  $^3\text{H}$ -aldosteron als verliesindicator.

Na voórextractie van de urine, waarbij het vrij in urine voorkomende aldosteron wordt verwijderd, wordt de verliesindicator toegevoegd. Vervolgens wordt gehydrolyseerd bij pH 1, waarbij aldosteron vrijkomt uit het 3-oxo-conjugaat. Na extractie van dit vrijgemaakte aldosteron wordt het extract door wassingen en vloeistof/vloeistof-partitie gezuiverd. Na deze bewerkingen wordt het extract gechromatografeerd op een silicagellaag (viervoudige ontwikkeling). Het op deze wijze gezuiverde aldosteron wordt geacetyleerd met  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride waarna het acetyleringsproduct wordt gewassen. Vervolgens wordt dit product gechromatografeerd op een silicagellaag en na elutie van de aldosterondiacetaatzône wordt het eluaat - na afdampen van het oplosmiddel - gechromatografeerd op een tweede silicagellaag, nu in twee richtingen. Een gedeelte van het eluaat van dit laatste chromatogram wordt gebruikt voor meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio (ratio 1) waarna de rest ervan wordt ingedampd en gechromatografeerd op papier. Van dit papierchromatogram wordt een "scan" vervaardigd om een indruk te krijgen van de zuiverheid van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat. Na elutie van de diacetaatzône wordt een gedeelte van het eluaat genomen voor meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio (ratio 2) en de rest wordt - na afdampen van het oplosmiddel - gechromatografeerd op een laatste dunnelaag. Ook in het eluaat van de aldosterondiacetaatzône van dit chromatogram wordt de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio gemeten (ratio 3). Uit de ratio's 1 t/m 3 moet blijken of een constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding is verkregen. Wanneer een nadere controle wenselijk is op de specificiteit kan de hydrolyse tot  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat worden toegepast.

Met de methode kan zowel de renale excretie van het 3-oxo-conjugaat als de adrenale secretie van aldosteron worden gemeten. De secretie wordt bepaald door na intraveneuze toediening van  $^3\text{H}$ -aldosteron de isotoopdilutie in vivo te meten. Afgezien van de toediening van de tracer is de werkwijze voor beide metingen dezelfde.

In dit hoofdstuk wordt de methode in detail beschreven. Na vermelding van reagentia, materialen en apparatuur (§ 2 en 3) volgt een beschrijving van de uitvoering van de excretiebepaling (§ 4) en de modificaties die noodzakelijk zijn voor de secretiesnelheidsmeting (§ 5). Vervolgens worden bijzonderheden betreffende de technische uitvoering van de chromatografie behandeld (§ 6) en tenslotte de uitvoering van de bepaling van de specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride.

## § 2. REAGENTIA EN MATERIALEN

De organische oplosmiddelen werden op de volgende wijze gezuiverd: dichloormethaan, dichloorethaan, chloroform, tetrachloormethaan, benzeen, cyclohexaan, petroleumether (80-100) en toluen werden door een silicagelkolom (150 x 3 cm) gevoerd. Om een goede doorstroming te verkrijgen werden de silicagel gemengd met Hyflo Super-cel in de verhouding 3:1. De oplosmiddelen werden daarna gedestilleerd. De chloroform werd gestabiliseerd door toevoegen van 1% absolute alcohol. Aceton werd na toevoegen van kaliumpermanganaat gekookt onder terugvloeiing en daarna gedestilleerd. Ethanol en methanol werden met zink- en kaliumhydroxyde op dezelfde wijze behandeld en vervolgens gedestilleerd. Benzeen werd watervrij gemaakt door te behandelen met natrium waarna werd gedestilleerd. Pyridine werd onder terugvloeiing gekookt boven bariumoxyde en daarna gefractioneerd gedestilleerd. Azijnzuuranhydride werd met calciumcarbide gekookt en twee keer gedestilleerd.

Silica Gel G (Merk) voor dunnelaagchromatografie

Silicagel (Mallinckrodt 100 mesh) voor zuiveringskolommen

Hyflo Super-cel (N.V. Profiltra) voor zuiveringskolommen

Fluorescerend silicaat (S.5. Grün/1 GmbH - Heidelberg)

Natriumsulfaat anhydrisch (p.a. Merck)

Zoutzuur 4 N; Natronloog 1 N en 0,1 N; Azijnzuur 0,1 M; Methanol 70% en 20% (v/v)

Chromatografiepapier Whatman no.1 en no.3

2,5-difenyloxazol (PPO, Packard Instr.Comp.)

1,4-bis-2-(4-methyl-5-fenyloxazolyl)benzeen (dimethyl POPOP, Packard Instr. Comp.)

Samenstelling van de scintillatievloeistof die normaal wordt gebruikt: 3 g PPO en 200 mg dimethyl-POPOP opgelost in 1 liter toluen

Samenstelling van de scintillatievloeistof volgens BRAY (1960) die voor de bepaling van  $^3\text{H}$  in urine wordt gebruikt:

60 g   naphtaleen  
4 g    PPO  
0,2 g   dimethyl-POPOP  
100 ml absolute methanol  
20 ml ethyleenglycol met dioxaan tot 1 liter  
aanvullen tot 1 liter met dioxaan

d-Aldosteron (researchpreparaat CIBA). 19,15 mg van dit preparaat werd opgelost in 50,00 ml ethanol. Een deel van deze oplossing werd 1 : 100 verdund met absolute ethanol. De oplossingen werden bij -20°C bewaard en gebruikt voor de bepaling van de specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride.

Aldosteron (Organon, ampullen waarin 0,5 mg). De inhoud van tien ampullen werd geëxtraheerd met dichloormethaan. Na indampen van het dichloormethaanextract werd gezuiverd door middel van dunnelaag-chromatografie. Als referentiesteroïd werd het CIBA researchpreparaat gebruikt. De aldosteronzône werd geëluëerd en het eluaat werd ingedampt. Dit gezuiverde aldosteron werd gebruikt als referentiesteroïd voor de chromatografie.

Cortisolacetaat (Steraloids Inc.), smeltpunt 225,6°C. Het preparaat werd ter controle gechromatografeerd op een silicagellaag in het systeem chloroform-aceton, 90 : 10 (v/v) en in het systeem ethylacetaat-dichloorethaan-water, 90 : 10 : 1 (v/v) met  $R_f$ -waarden van respectievelijk 0,15 en 0,75. Buiten de cortisolacetaatzône werden onder U.V.-licht geen andere vlekken waargenomen. Van dit preparaat werd 10,00 mg afgewogen en opgelost in 100 ml absolute ethanol. Deze oplossing werd 1 : 10 verdund met ethanol. De oplossingen werden bij -20°C bewaard en gebruikt voor bepaling van de specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride.

1,2- $^3\text{H}$ -d-Aldosteron werd betrokken van New England Nuclear Corporation. De specifieke activiteit was 44 C/mmol. De inhoud van de ampullen werd met absolute ethanol verdund tot oplossingen met 3,2 tot  $4,6 \times 10^6$  dpm  $^3\text{H}$ /ml. Het steroïd werd ter controle op zuiverheid gechromatografeerd op papier in het systeem cyclohexaan-benzeen-methanol-water, 5:10:10:4 (v/v). Van het chromatogram werd een "scan" gemaakt, waaruit kon worden beoordeeld of een enkelvoudige radioactiviteitspiek aanwezig was. De  $R_f$ -waarde van deze piek werd vergeleken met die van authentiek aldosteron en vervolgens werd de aldosteronzône geëluëerd evenals de rest van het chromatogram. Van de totaal op het chromatogram aanwezige  $^3\text{H}$ -radioactiviteit moet minstens 95% op de aldosteronplaats aanwezig zijn. Het is noodzakelijk de controle eenmaal per maand te herhalen.

$^{14}\text{C}$ -Aziijnzuuranhydride (aziijnzuur-1- $^{14}\text{C}$ -anhydride) werd betrokken van New England Nuclear Corporation. De specifieke activiteit was 10 mC/mmol (20% v/v in benzeen). De inhoud van de ampul werd verdund met ongemerkt aziijnzuuranhydride (20% v/v in benzeen) in de verhouding 1 : 5. De verdunning (specifieke activiteit 2 mC/mmol) werd in een met ingeslepen stop afgesloten buis bewaard in een afgesloten vat waarin benzeen en calciumchloride aanwezig waren. Het reagens werd bij een temperatuur rond het vriespunt bewaard.

$^3\text{H}$ -Tolueen standaard; activiteit  $2,08 \times 10^6$  dpm/ml (New England Nuclear Corporation).

$^{14}\text{C}$ -Tolueen standaard; activiteit  $3,83 \times 10^5$  dpm/ml (New England Nuclear Corporation). Deze standaarden werden bij  $-20^\circ\text{C}$  bewaard. Voor het samenstellen van de ijkmonsters voor de scintillatietelling werd van deze preparaten een nauwkeurige hoeveelheid afgewogen en met scintillatievloeistof (10 ml) gemengd. De ijkmonsters bevatten respectievelijk 208.000 dpm  $^3\text{H}$  en 191.500 dpm  $^{14}\text{C}$ .

### § 3. APPARATUUR

Vloeistofscintillatietellers (Nuclear - Chicago, system 725 en Packard, type 314 E)

Papierchromatogram-scanner (Vanguard, type 880)

Dunnelaag-scanner (Desaga, type 12-20)

Dunnelaag-uitstrijkapparaat (Desaga, nr.601)

U.V.-lamp (Hanovia, chromatolite 253,7 m $\mu$ )

Roterende vacuümverdamer (Büchi)

pH-Meter (Electrofact, 53A)

Telflesjes (Packard, uitwendige diameter 2,7 cm)

Tanks voor dunnelaagchromatografie, inwendige afmetingen 24 x 7,5 x 27 cm, afgesloten met een geslepen glasplaat.

Tanks voor papierchromatografie, inwendige afmetingen 60 x 19 x 30 cm, afgesloten met een, van een viltrand voorziene, glasplaat. In de tank zijn op 6 cm onder de bovenrand troggen aangebracht voor afdalende chromatografie.

Spectrofotofluorimeter (Aminco Bowman, no.4-8202)

### § 4. UITVOERING VAN DE BEPALING VAN ALDOSTERON

De bepalingmethode is schematisch weergegeven in figuur 3. De verschillende stappen worden in deze paragraaf in detail besproken, waarbij de bepaling van de excretie van het 3-oxo-conjugaat van aldosteron per 24-uurs urine als voorbeeld dient. De bepaling van de se-

cretiesnelheid van aldosteron wijkt hiervan af op het punt van de toediening van de tracer. In de volgende paragraaf komt dit verschilpunt nader aan de orde.

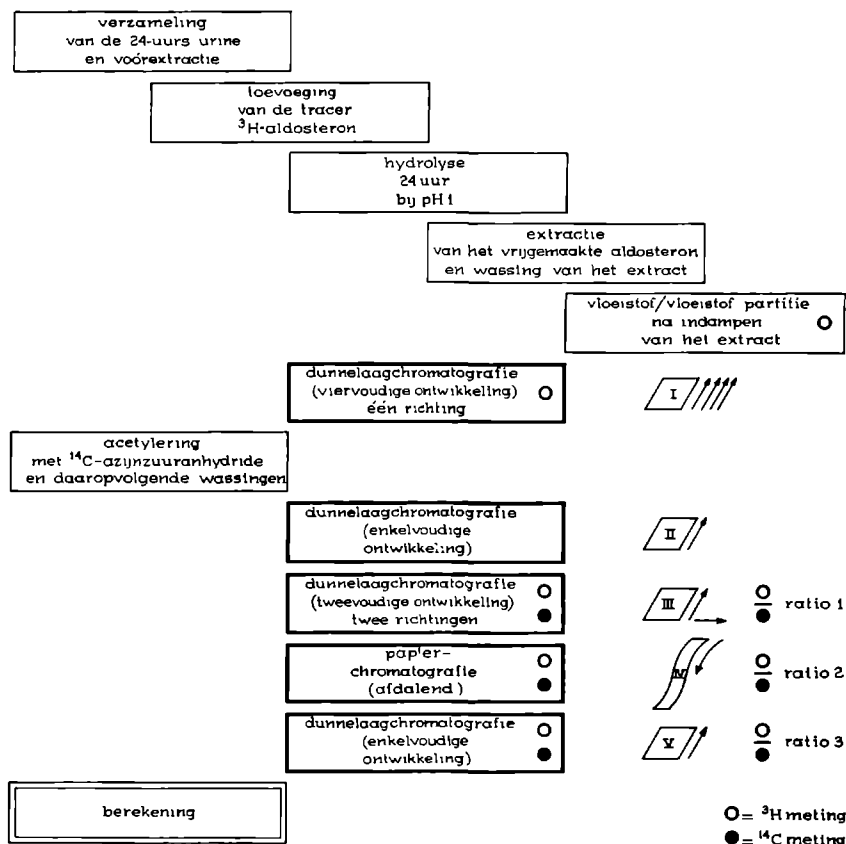


Fig.3. Schema van de bepalingsmethode

## Verzameling van de urine en voórextractie

Het volume van de 24-uurs urine wordt gemeten waarna met 4 N zoutzuur de pH op 5 wordt gebracht. Bij deze pH kan de urine in diepgevroren toestand ( $-10^\circ\text{C}$ ) verscheidene maanden worden bewaard zonder aanzienlijk verlies van aldosteron.

De bepaling wordt uitgevoerd op 1/5 gedeelte van de 24-uurs urine. Het vrije aldosteron wordt verwijderd door de urine éénmaal met een viervoudige hoeveelheid dichloormethaan te extraheren.

### Toevoeging van de tracer

Aan de vóóргеëxtraheerde urine wordt een bepaald volume van een standaardoplossing van  $^3\text{H}$ -aldosteron toegevoegd. De toegevoegde hoeveelheid  $^3\text{H}$ -radioactiviteit wordt vastgesteld door eenzelfde volume van de standaardoplossing in een telflesje te pipetteren en te meten. De hoeveelheid dient ongeveer 50.000 dpm te bedragen, hetgeen overeenkomt met circa 0,3 nanogram aldosteron.

### Zure hydrolyse

De urine wordt met 4 N zoutzuur op pH 1 gebracht. De hierbij te gebruiken pH-meter dient nauwkeurig te worden geijkt voor het lage pH-gebied. De aangezuurde urine wordt gedurende 24 uur bij kamertemperatuur in het donker bewaard.

### Extractie

De urine wordt éénmaal geëxtraheerd met een zevenvoudig volume dichloormethaan, waarbij gedurende 5 minuten krachtig wordt geschud. De bovenstaande waterige laag wordt door aspiratie verwijderd, waarna het dichloormethaanextract achtereenvolgens wordt gewassen met 0,1 volumedeel 1 N en 0,1 N natronloog, 0,1 M azijnzuur en gedestilleerd water. Het gewassen extract wordt gedroogd met natriumsulfaat en vervolgens ingedampt bij 35°C met behulp van de roterende vacuümverdamper. Het residu wordt met enkele porties dichloormethaan in een buis van 20 ml overgespoeld waarna het oplosmiddel wordt afgedampt\*).

### Vloeistof/vloeistof-partitie

Het residu wordt opgelost in 8 ml 70% methanol en vervolgens twee keer geschud met 2 ml van een mengsel van petroleumether-tolueen, 1:1 (v/v) waarbij de bovenlaag telkens door aspiratie wordt verwijderd. De methanol wordt uit het waterige, methanolische extract verwijderd door indampen. Het waterige residu wordt met gedestilleerd water aangevuld tot ongeveer 3 ml en wordt vervolgens drie keer geëxtraheerd met 4 ml

---

\*) Het af- en indampen van extractievloeistoffen geschiedt door bij een temperatuur van 35 tot 40°C een luchtstroom over de vloeistof te leiden.



dichloormethaan. Het dichloormethaan wordt uit het extract verdampt. Na deze bewerkingen kan het extract gechromatografeerd worden. Eventueel wordt een gedeelte van het extract gebruikt voor een meting van de  $^3\text{H}$ -radioactiviteit.

### Chromatografie vóór acetylering

**Dunnelaagchromatogram I.** De verdampingsrest wordt in dichloormethaan in twee smalle banden van 3 cm lengte op de basislijn opgebracht. Aan weerszijden van deze banden (op een afstand van  $1\frac{1}{2}$  cm) wordt als referentiesteroïd aldosteron opgebracht. De silicagelplaat wordt twee keer gechromatografeerd in systeem 1 en vervolgens eenmaal in elk der systemen 2 en 3. De  $R_f$ -waarden van aldosteron en aldosterondiacetaat in de diverse systemen zijn vermeld in tabel V. Het resultaat der chromatografie kan na elk der systemen onder U.V.-licht (253,7 m $\mu$ ) worden gevolgd. Na het laatste systeem wordt de zône,

T a b e l   V  
 $R_f$ -waarden van aldosteron en aldosterondiacetaat  
in de gebruikte systemen

Chromatogram	Systeem	Aldosteron	Aldosteron-diacetaat
I	1	0	
	2	0,30	
	3	0,40	
II	4		0,55
III	2		0,65
	4		0,30
IV	5		0,65
V	6		0,60

Systeem 1 (dunnelaagchromatografie) chloroform - ethanol, 99 : 1 (v/v)

Systeem 2 (dunnelaagchromatografie) ethylacetaat - ethyleendichloride - water, 90 : 10 : 1 (v/v)

Systeem 3 (dunnelaagchromatografie) chloroform - methanol - water, 94 : 6 : 0,5 (v/v)

Systeem 4 (dunnelaagchromatografie) chloroform - aceton, 90 : 10 (v/v)

Systeem 5 (papierchromatografie) cyclohexaan - benzeen - methanol - water, 6 : 2 : 5 : 1 (v/v)

Systeem 6 (dunnelaagchromatografie) benzeen - aceton - ethanol, 85 : 10 : 5 (v/v)

overeenkomend met het referentie-aldosteron, gemarkeerd en opgezogen in het elutie-apparaat. Vervolgens wordt geëluëerd met ongeveer 10 ml ethanol, waarbij het eluaat wordt opgevangen in een acetyleringsbuis. Voor het meten van de  $^3\text{H}$ -radioactiviteit kan 5% van het eluaat worden overgebracht in een telflesje. Het eluaat wordt verdampt, waarbij ervoor gezorgd dient te worden, dat het residu wordt geconcentreerd in het puntvormig uitgetrokken deel van de acetyleringsbuis. Voor het verwijderen van de laatste waterresten wordt de buis direct vóór de acetylering gedurende 3 uur in vacuo gedroogd boven calciumchloride.

### Acetylering

In de punt van de acetyleringsbuis wordt 0,030 ml pyridine en 0,025 ml  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride\*) gebracht. Na goed afsluiten wordt de buis op de Vortex-mixer geroteerd om het residu op te lossen. Het acetyleringsmengsel wordt gedurende 15 uur in een stoof van  $37^\circ$  geplaatst.

Na de acetylering wordt, ter verwijdering van de overmaat azijnzuuranhydride, 5 ml tetrachloorkoolstof toegevoegd en 1 ml 20% ethanol, waarna krachtig wordt geschud. Na verwijderen van de bovenlaag wordt de tetrachloorkoolstof nog een tweede keer gewassen met 20% methanol en tenslotte twee keer met 1 ml water. Deze wassingen geschieden in een zuurkast; de wasvloeistoffen worden in sterke loog opgevangen. De tetrachloorkoolstof wordt verdampt en het residu wordt opgelost in 2 ml tetrachloorkoolstof waarna dit weer wordt afgedampt. Dit wordt herhaald met nogmaals 2 ml tetrachloorkoolstof en tenslotte met 1 ml ethanol abso-luut

### Chromatografie na acetylering

**Dunnelaagchromatogram II.** Aan het acetyleringsprodukt wordt  $10\mu\text{g}$  aldosterondiacetaat toegevoegd en het mengsel wordt op een silicagelplaat gebracht als een smal bandje van 1 cm lengte. Aan weerszijden van dit bandje wordt als referentiesteroïd aldosterondiacetaat geapplied. De plaat wordt gechromatografeerd in systeem 4. De aldosterondiacetaatzône wordt onder U.V.-licht gemarkeerd, daarna in het elutie-apparaat opgezogen en geëluëerd met circa 8 ml 96% ethanol. Het oplosmiddel van het eluaat wordt afgedampt en het residu, in dichloormethaan, puntvormig op de volgende silicagelplaat gezet, 3 cm vanaf de linker- en onderrand van de plaat.

---

\*) Sinds kort is  $^{14}\text{C}$ -aldosteron via de handel verkrijgbaar. Door dit gemerkte steroïd als verliesindicator te gebruiken is het mogelijk het kostbare  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride te vervangen door het relatief goedkope  $^3\text{H}$ -azijnzuuranhydride.

**Dunnelaagchromatogram III** De plaat wordt eerst in systeem 2 ontwikkeld en vervolgens, in een richting loodrecht daarop, in systeem 4. Na deze laatste chromatografie wordt de aldosterondiacetaatvlek gemarkeerd en op de gebruikelijke wijze geëluëerd. Van het eluaat wordt een deel (10 of 20%) genomen voor meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding.

**Papierchromatogram IV.** Het geconcentreerde eluaat wordt na toevoeging van 20  $\mu\text{g}$  aldosterondiacetaat op de startlijn van een papierchromatogram gebracht als een smal bandje met een lengte van 1 cm. Na chromatografie in systeem 5 wordt de U.V.-licht absorberende aldosterondiacetaatzône op de papierstrook aangetekend, waarna de radioactiviteitsverdeling over het papier wordt geregistreerd met behulp van de "scan"-apparatuur. De aldosterondiacetaatzône wordt geëluëerd met 8 - 10 ml 96% ethanol. Voor meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding wordt een vijfde deel van het eluaat genomen.

**Dunnelaagchromatogram V.** Het eluaat van het papierchromatogram wordt uitgedampt en het residu wordt met behulp van dichloormethaan puntvormig opgezet op een silicagellaag. Er wordt gechromatografeerd in systeem 6, waarna detectie en elutie op de gebruikelijke wijze plaats vinden. Het eluaat kan geheel of gedeeltelijk worden gebruikt voor de meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding, afhankelijk van de wenselijkheid om al of niet over te gaan tot de vorming van aldosteronmonoacetaat.

#### Meting van de radioactiviteit

De te meten monsters worden in een telflesje gebracht en, nadat het oplosmiddel is verdampt, worden 0,1 ml absolute ethanol en 10 ml scin-

T a b e l VI  
Stand van de vloeistofscintillatieteller

	Course	Fine	Meter
Data High voltage	11	10	1480 V
Gate High voltage	13	8	1519 V
Data attenuator	1,95	0,32	
Discriminator L 2	9	9	
Discriminator L 3	0	5	
Discriminator L 4	6	0	
Discriminator L 5	1	5	

tillatievloei stof toegevoegd. In onze experimenten werd elk monster twee keer 20 minuten geteld in de vloeistofscintillatieteller met een "preset count" van  $10^6$  cpm, bij de stand van het instrument zoals weergegeven in tabel VI. Monsters waarin één van beide isotopen ( $^3\text{H}$  of  $^{14}\text{C}$ ) of beide aanwezig waren, werden bij dezelfde stand van het instrument gemeten. De "efficiencies" van de tellingen in de twee kanalen voor beide isotopen werden dagelijks vastgesteld met behulp van de zelf samengestelde  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -standaarden.

Voor de berekening van de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit (uitgedrukt in dpm = desintegraties per minuut) werd de "simultaneous equation method" toegepast, die voor het eerst beschreven is door OKITA c.s. (1957).

De volgende vergelijkingen die in 5.11 nader worden besproken, werden gebruikt:

$$\text{dpm } ^3\text{H} = \frac{N_1 c_2 - N_2 c_1}{h_1 c_2 - h_2 c_1}$$

$$\text{dpm } ^{14}\text{C} = \frac{N_2 h_1 - N_1 h_2}{h_1 c_2 - h_2 c_1}$$

waarin:

$N_1$  = aantal counts geregistreerd in kanaal 1 (minus background)

$N_2$  = aantal counts geregistreerd in kanaal 2 (minus background)

$c_1$  = efficiency van de  $^{14}\text{C}$ -telling in kanaal 1

$c_2$  = efficiency van de  $^{14}\text{C}$ -telling in kanaal 2

$h_1$  = efficiency van de  $^3\text{H}$ -telling in kanaal 1

$h_2$  = efficiency van de  $^3\text{H}$ -telling in kanaal 2

### Berekening van de excretie van aldosteron

De volgende formule wordt gebruikt voor de berekening:

$$\text{Excretie van aldosteron in } \mu\text{g}/24 \text{ uur} = \frac{a}{s} \times \frac{1}{R} \times M \times f$$

waarin:

$a$  = aantal dpm  $^3\text{H}$ -aldosteron toegevoegd aan het te bepalen urinemonster

$s$  = specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride in dpm/ $\mu\text{mol}$

$R$  =  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio (dpm/dpm)

$M$  = moleculair gewicht van aldosteron (360)

$f = \frac{\text{volume 24-uurs urine}}{\text{volume genomen}}$

## Hydrolyse van $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat tot $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat

Wanneer het bij een individuele bepaling wenselijk is om de specificiteit nader te controleren kan de vorming van aldosteronmonoacetaat toegepast worden.

Het restant van het eluaat van het laatste dunnelaagchromatogram (V) wordt uitgedampt, waarna aan de verdampingsrest 0,5 ml 1,0 M azijnzuur wordt toegevoegd. Na 4 uur hydrolyse in een gesloten buis bij een temperatuur van  $60^\circ\text{C}$ , wordt afgekoeld tot kamertemperatuur. Het gevormde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat wordt geëxtraheerd met 10 ml dichloormethaan. Na concentreren van het dichloormethaan-extract wordt dit puntvormig op een dunnelaag opgebracht en gechromatografeerd in systeem 4. Na detectie wordt de aldosteronmonoacetaat-vlek op de gebruikelijke wijze geëluëerd en het eluaat wordt gebruikt voor meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding.

## § 5. BEPALING VAN DE SECRETIESNELHEID VAN ALDOSTERON

De bepaling van de secretiesnelheid van aldosteron verloopt identiek aan die van de in § 4 besproken bepaling van de excretie van het 3-oxo-conjugaat, behoudens het toevoegen van de tracer. Bij secretiesnelheidsmetingen wordt het  $^3\text{H}$ -aldosteron intraveneus toegediend.

Van de alcoholische oplossing van  $^3\text{H}$ -aldosteron wordt circa 2 ml in een weegflesje gebracht en deze hoeveelheid wordt gewogen. Vervolgens wordt een zo groot mogelijk volume van de afgewogen hoeveelheid opgetrokken in een injectiespuit, waarin 20 ml gesteriliseerde 5% glucose-oplossing aanwezig is. Het weegflesje wordt daarna weer gewogen. Nadat de inhoud van de spuit goed is gemengd, wordt de vloeistof langzaam intraveneus geïnjecteerd (met voldoende voorzorgen voor toediening van de totale inhoud van de spuit). De injectiespuit wordt vervolgens zorgvuldig met dichloormethaan gespoeld waarna het dichloormethaan wordt afgedampt en de radioactiviteit van het residu wordt gemeten.

Uit de twee wegingen kan, met correctie voor de in de injectiespuit achtergebleven  $^3\text{H}$ -radioactiviteit, de hoeveelheid  $^3\text{H}$ -aldosteron die werd geïnjecteerd berekend worden.

Na de injectie wordt de urine over een periode van 24 uur verzameld. Het urinevolume wordt gemeten en de kreatinine-uitscheiding wordt bepaald. De kreatinine-uitscheiding wordt vergeleken met die van een aantal dagen vóór en na de dag van de meting van de secretiesnelheid van aldosteron.

Ter controle op de uitscheiding van  $^3\text{H}$ -radioactiviteit wordt 1 ml van de verzamelde urine gemengd met 15 ml van de scintillatievloe-

stof volgens BRAY (1960) en de  $^3\text{H}$ -radioactiviteit wordt gemeten. Om het aantal cpm (cpm = counts per minuut) om te kunnen rekenen in het aantal dpm  $^3\text{H}$  wordt vervolgens aan de inhoud van het telflesje een bekende hoeveelheid  $^3\text{H}$ -aldosteron toegevoegd waarna opnieuw de  $^3\text{H}$ -radioactiviteit wordt gemeten. Uit beide radioactiviteitsmetingen kan de efficiency van de telling worden berekend en daarmee de totale hoeveelheid  $^3\text{H}$  die in de verzamelperiode met de urine is uitgescheiden.

Om te controleren welk gedeelte van het ingespoten  $^3\text{H}$ -aldosteron niet wordt gemetaboliseerd, wordt van het vóórextract van de urine de dichloormethaan afgedampt en de  $^3\text{H}$ -radioactiviteit van het residu gemeten.

De bepaling verloopt vanaf dit punt identiek aan de in § 4 beschreven excretiemeting. Voor de berekening van de secretiesnelheid van aldosteron wordt de volgende formule gebruikt:

$$\text{Secretiesnelheid van aldosteron in } \mu\text{g}/24 \text{ uur} = \frac{a}{s} \times \frac{1}{R} \times M$$

waarin:

a = aantal dpm  $^3\text{H}$ -aldosteron geïnjecteerd

s = specifieke activiteit azijnzuuranhydride dpm/ $\mu\text{mol}$

R =  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio (dpm/dpm)

M = moleculair gewicht van aldosteron (360)

## § 6. BIJZONDERHEDEN BETREFFENDE DE UITVOERING VAN DE CHROMATOGRAFIE

In onze methode wordt gebruik gemaakt van dunnelaagchromatografie op silicagellagen en van papierchromatografie in een systeem van het Bush-type. In deze paragraaf worden nadere bijzonderheden verstrekt betreffende de praktische uitvoering van deze chromatografische technieken.

**Dunnelaagchromatografie.** De silicagellaag wordt op de volgende wijze op de glasplaten aangebracht: 22,5 g Silica Gel G en 2,5 g van het fluorescerende silicaat worden in een gesloten erlenmeyer gedurende 30 seconden geschud met 50 ml gedestilleerd water. Het mengsel wordt met behulp van het uitstrijkapparaat verdeeld over 5 glasplaten (20 x 20 cm) met een laagdikte van 0,25 mm. De platen worden, na circa 90 minuten bij kamertemperatuur te hebben gedroogd, gedurende 20 minuten op  $110^\circ\text{C}$  geactiveerd en daarna opgeborgen in een "droogkast". Extracten en referentiesteroïden worden op 2 cm vanaf de onderrand van de plaat opgebracht en 10 cm boven deze basislijn wordt een groeve aangebracht in de silicagellaag. Het opbrengen van de uitgedampte extracten en eluaten en van de referentiesteroïden geschiedt met behulp van dichloormethaan als oplosmiddel. Om bij het opbrengen de laag van silicagel niet of zo weinig mogelijk te beschadigen, wordt over de uit-

stroomopening van de pipet, waarmee wordt opgebracht, een flexibele teflon punt geschoven.

Lr wordt opstijgend gechromatografeerd. Bij de chromatografie behoeven geen speciale voorzorgsmaatregelen genomen te worden voor het constant houden van de temperatuur of voor de verzadiging van de tanks; de loopvloeistof (circa 100 ml) wordt een half uur vóór de "run" in de tank gebracht. Dezelfde loopvloeistof wordt niet meer dan twee keergebruikt. De platen worden onder een hoek van  $75^{\circ}$  in de tank geplaatst en bij kamertemperatuur gechromatografeerd. Het vloeistof-front bereikt de merkstreep in circa 30 minuten. Na de chromatografie wordt de plaat gedurende enkele minuten aan de lucht gedroogd waarna, bij een kort durende inspectie onder de U.V.-lamp, de U.V.-licht absorberende vlekken (of banen) worden vergeleken met de plaats van het referentie-aldoosteron. De aldosteronzône wordt steeds direct na de chromatografie geëluëerd waarbij gebruik wordt gemaakt van het extractie-apparaat (gewijzigd naar MATTHEWS c.s. 1962) (figuur 4). Als elutiemiddel wordt 96% ethanol gebruikt.

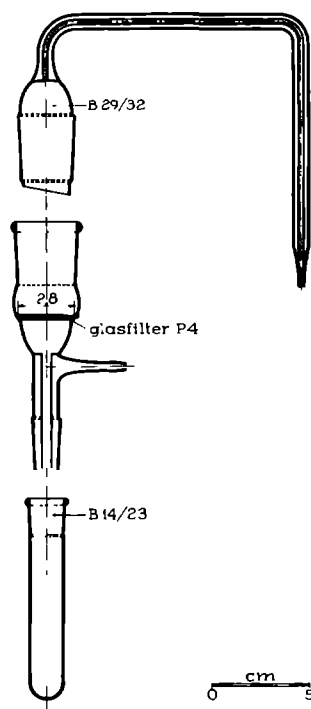


Fig.4. Apparaat, toegepast bij dunnelaagchromatografie, voor het opzuigen en extraheren van silicagel

**Papierchromatografie.** Het Whatman-papier no.1 wordt gedurende drie dagen met methanol geëxtraheerd in een Soxhlet-apparaat. Voor de afmetingen van het papierchromatogram zie figuur 5. De te chro-

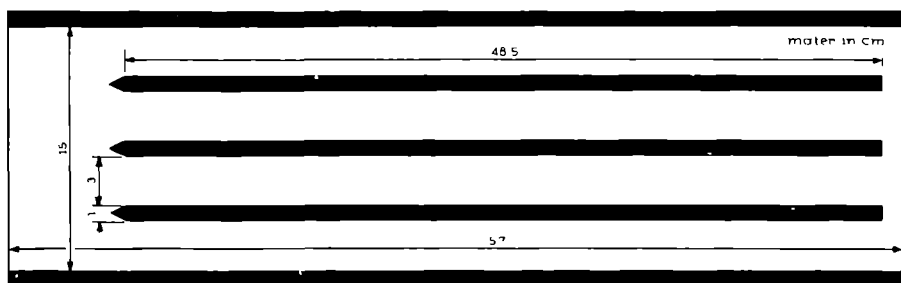


Fig.5. Model van het papierchromatogram

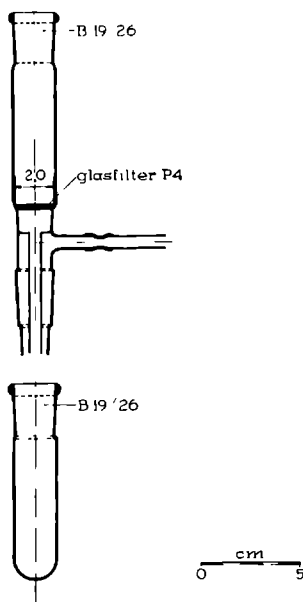


Fig.6. Elutie-apparaat, toegepast bij papierchromatografie

matograferen monsters worden opgelost in dichloormethaan of in ethanol en opgebracht als een smal bandje met een lengte van 1 cm. Er wordt afdalend gechromatografeerd bij een temperatuur tussen 30 en 35°C. Voor verzadiging van de tanks met het chromatografie-systeem



worden de zijwanden van de tanks voorzien van twee stroken Whatman-papier no.3. Deze stroken hangen in bakjes die onderin de tank zijn geplaatst en die gevuld zijn met de stationaire fase van het chromatografie-systeem (onderste laag). Op de bodem van de tank wordt de mobiele fase aangebracht in een laag ter hoogte van 2 cm. De equilibratietijd bedraagt minstens 3 uur; praktisch is het om het chromatogram 's avonds in te hangen en de volgende morgen de loopvloeistof in de trog te brengen; de chromatografie zal dan na 7 à 8 uur beëindigd kunnen worden (loopafstand circa 45 cm). Het chromatogram wordt daarna enkele minuten aan de lucht gedroogd en de U.V.-licht absorberende vlek wordt aangetekend. De verdeling van de radioactiviteit over het chromatogram wordt vastgelegd met behulp van de "scanner". Wanneer de U.V.-licht absorberende vlek en de radioactiviteitspiek met elkaar corresponderen wordt een symmetrisch gedeelte van de piek geëluëerd. Het desbetreffende gedeelte van het chromatogram wordt in snippers geknipt en in het elutie-apparaat gebracht (volgens GANIS c.s. 1961) (figuur 6). Op de snippers wordt 3 ml 96% ethanol gegoten en na één uur wordt door onderdruk de ethanol in de buis gezogen. Het papier wordt nog twee keer met 3 ml ethanol geëxtraheerd.

## § 7. BEPALING VAN DE SPECIFIEKE ACTIVITEIT VAN $^{14}\text{C}$ -AZIJNZUURANHYDRIDE

De specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride wordt op twee manieren bepaald, respectievelijk met behulp van cortisol en met behulp van aldosteron. In beide gevallen wordt het steroïd geacetyleerd met het te bepalen  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride (figuur 7), waarna de specifieke activiteit van de gevormde steroïdacetaten wordt gemeten.

Wanneer wordt uitgegaan van cortisol ontstaat een monoacetaat waarvan, zoals uit de figuur blijkt, de specifieke activiteit de helft is van die van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride. De specifieke activiteit van het cortisolacetaat volgt uit een radiometrische bepaling van de  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit en een fluorimetrische bepaling van het cortisolacetaat.

Bij de bepaling van de specifieke activiteit met behulp van aldosteron wordt een diacetaat gevormd waarvan de specifieke activiteit gelijk is aan die van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride. Er wordt een nauwkeurig bekende hoeveelheid zuiver aldosteron, na toevoegen van  $^3\text{H}$ -aldosteron, geacetyleerd met het te bepalen  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride. Na chromatografische zuivering van het diacetaat wordt de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding gemeten. Uit de hoeveelheid aldosteron waarvan werd uitgegaan, de hoeveelheid als verliesindicator toegevoegd  $^3\text{H}$ -aldosteron en de uiteindelijke  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding kan de specifieke activiteit (dpm  $^{14}\text{C}/\mu\text{g}$ ) van het gevormde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat worden berekend.

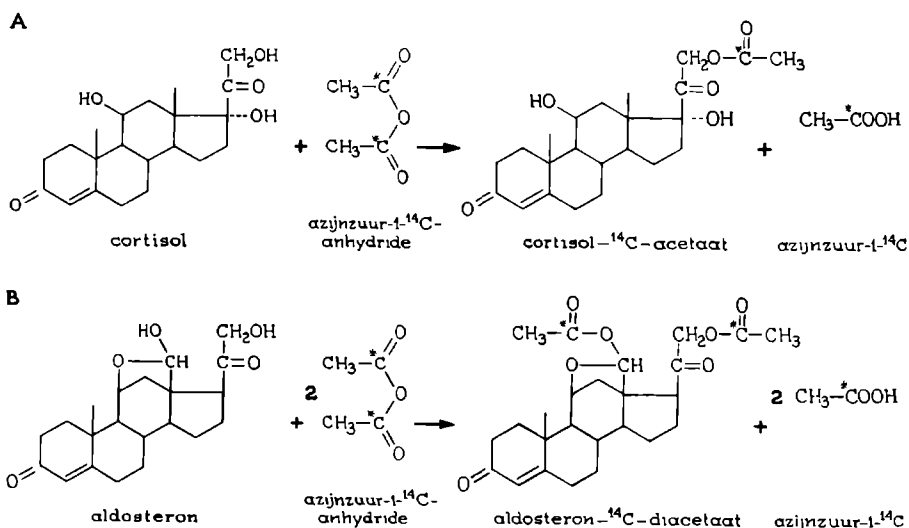


Fig.7. Reactievergelijkingen bij de bepaling van de specifieke activiteit van  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride met behulp van cortisol en aldosteron

## Uitvoering van de bepaling der specifieke activiteit

**Bepaling met behulp van cortisol.** Circa 200  $\mu\text{g}$  cortisol wordt geacetyleerd met het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride volgens de procedure zoals die voor aldosteron beschreven is in § 4. Het gewassen acetyleringsprodukt wordt als een smal bandje van 5 cm lengte op de basislijn van een dunnelaag gebracht en gechromatografeerd in systeem 4 (tabel V). De cortisolacetaatzone ( $R_f$ -waarde 0,75) wordt op de gebruikelijke wijze geëluëerd en het eluaat wordt geconcentreerd. Het residu wordt op een tweede dunnelaag gechromatografeerd in systeem 3. Na elutie van de cortisolacetaatzone wordt het eluaat geconcentreerd. Vervolgens wordt het eluaat verdeeld over vier banen van een papierchromatogram. Er wordt gechromatografeerd in het systeem cyclohexaan-benzeen-methanol-water, 5:10:10:4 (v/v). Na chromatografie wordt de U.V.-licht absorberende cortisolacetaatzone ( $R_f$ -waarde 0,75) gemarkeerd en van één der papierstroken wordt een radioactiviteits"scan" gemaakt. Als uit de "scan" blijkt dat het acetaat zuiver is, wordt de cortisolacetaatzone geëluëerd; één gedeelte van het eluaat wordt gebruikt voor meting van de  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit en een ander gedeelte voor de fluorimetrische bepaling van de hoeveelheid cortisol.

De fluorimetrische bepaling wordt als volgt uitgevoerd:  
Als standaard voor de ijklijn wordt gezuiverd cortisolacetaat gebruikt.

Van de standaardoplossing (10 µg/ml ethanol) worden hoeveelheden van 0,10, 0,20, 0,30 en 0,40 ml in duplo gepipetteerd in buizen van 10 ml. Na verdampen van het oplosmiddel wordt 2,00 ml fluorescentiereagens (zwavelzuur-ethanol, 70:30 v/v) toegevoegd, waarna het mengsel een uur bij kamertemperatuur wordt weggezet. Als blanco wordt 2,00 ml fluorescentiereagens genomen. De fluorescentie wordt gemeten bij 520 mµ met als golflengte van het instralende licht 470 mµ. Op dezelfde wijze wordt in duplo de fluorescentie bepaald van een deel van het cortisolacetaat-eluaat, waarbij eveneens de blanco waarde van het chromatografiepapier wordt bepaald. Na correctie voor de blanco is de concentratie aan cortisolacetaat af te lezen van de ijklijn.

Uit de resultaten van de radiometrische en fluorimetrische bepalingen wordt de specifieke activiteit als volgt berekend:

Specifieke activiteit van het azijnzuuranhydride in dpm/µmol =  $\frac{a}{b} \times M \times 2$

waarin:

a = aantal dpm  $^{14}\text{C}$  in een aliquot van het eluaat

b = aantal µg cortisolacetaat in eenzelfde volume van het eluaat

M = moleculair gewicht van cortisolacetaat (404)

**Bepaling met behulp van aldosteron.** Van de standaardoplossing van zuiver aldosteron in ethanol (3,83 µg/ml) wordt 3,00 ml in een acetyleringsbuis gemengd met circa  $10^6$  dpm  $^3\text{H}$ -aldosteron. De juiste hoeveelheid  $^3\text{H}$ -aldosteron die is toegevoegd wordt bepaald door een identieke hoeveelheid in een telflesje te pipetteren en deze te meten. Na zorgvuldige menging wordt de inhoud van de acetyleringsbuis onder in de punt geconcentreerd, waarna acetylering en de daaropvolgende wassing en chromatografie worden uitgevoerd volgens de procedure beschreven in § 4. Wanneer een constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio is verkregen, wordt de specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride berekend met de formule:

Specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride in dpm/µmol =  $\frac{a}{b} \times \frac{1}{R} \times M$

waarin:

a = aantal dpm  $^3\text{H}$ -aldosteron toegevoegd als verliesindicator

b = aantal µg aldosteron dat werd geacetyleerd

R =  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio (dpm/dpm)

M = moleculair gewicht van aldosteron (360)

## HOOFDSTUK V

### TOETSING VAN DE METHODE

#### § 1. INLEIDING

In dit hoofdstuk worden de experimenten beschreven die zijn verricht om de betrouwbaarheid en de bruikbaarheid van de methode te toetsen. In het algemeen zijn betrouwbaarheid en bruikbaarheid slechts dan gewaarborgd, als de analyse specifiek, voldoende gevoelig, reproduceerbaar en nauwkeurig is (BORTH 1952, LORAINE 1958, DICZFALUSY 1957, OERTEL 1962).

*De specificiteit* van de dubbel-isotoop methode voor de bepaling van aldosteron berust hoofdzakelijk op de chromatografische zuivering van het hormoon en zijn derivaten (respectievelijk het di- en monoacetaat). De gebruikte chromatografie-systemen worden verantwoord (§ 2) aan de hand van de  $R_f$ -waarden van een aantal steroïden en hun acetaten in systemen die vóór en na acetylering worden gebruikt. De mate van zuiverheid van het aldosterondiacetaat, die met de chromatografie-systemen wordt bereikt, blijkt uit de radioactiviteits"scans" die in dezelfde paragraaf zijn opgenomen. Na bespreking van experimenten betreffende de ontleding van aldosteron tijdens dunnelaagchromatografie (§ 3) volgt een behandeling van het verschijnsel isotoopfractionering (§ 4). Tengevolge van dit verschijnsel is één van de algemene criteria voor specificiteit, namelijk constant zijn van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio over de chromatografische vlek onbruikbaar geworden.

De specificiteit van onze methode wordt het duidelijkst gedemonstreerd door het constant zijn van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio na voortgezette chromatografie (§ 5) en de verdubbeling van de ratio na hydrolyse van aldosterondiacetaat tot het monoacetaat (§ 6).

*De gevoeligheid* van de methode kan worden gedefinieerd als de laagst meetbare concentratie, die nog van de blanco waarde kan worden onderscheiden. De onderste gevoeligheidsgrens is bij een gegeven specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride afhankelijk van de blanco waarde (§ 7) en de terugwinning van de tracer (§ 8).

*De reproduceerbaarheid* van de methode wordt nagegaan door diverse urinemonsters herhaalde malen te meten en door een tweetal concentraties zuiver aldosteron meerdere keren te bepalen (§ 9). De reproduceerbaarheid van de meting van de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit wordt eveneens onderzocht (§ 11).

*De nauwkeurigheid* van de methode is in hoge mate afhankelijk van de nauwkeurigheid van de meting van de specifieke activiteit van het azijnzuuranhydride (§ 10) en van de meting van de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit (§ 11). Een indruk van de nauwkeurigheid van de methode in zijn geheel wordt verkregen uit de experimenten betreffende de terugwinning van aan urine toegevoegde hoeveelheden aldosteron (§ 12).

## § 2. VERANTWOORDING VAN DE GEBRUIKTE CHROMATOGRAPHIE-SYSTEMEN

Het doel van de chromatografische procedure vóór acetylering was aldosteron verregaand te zuiveren van steroïden en onbekende U.V.-licht absorberende stoffen die in urine-extracten voorkomen. We hebben daartoe gebruik gemaakt van dunnelaagchromatografie met meer-voudige ontwikkeling. Dit houdt in dat achtereenvolgens in verschillende systemen wordt gechromatografeerd op dezelfde silicagellaag (chromatogram I, figuur 3).

Na twee "runs" in het systeem chloroform-ethanol, 99:1 (v/v) bevinden aldosteron en andere corticosteroïden zich nog op de basislijn, terwijl een aantal chromogenen en U.V.-licht absorberende stoffen zich in de richting van het front hebben verplaatst. In het daaropvolgende, naar BENNETT en HEFTMANN (1962) gewijzigde systeem ethylacetaat-dichloorethaan-water, 90:10:1 (v/v) is de  $R_f$ -waarde van aldosteron 0,30; de bovengenoemde chromogenen en de U.V.-licht absorberende stoffen bewegen zich in dit systeem verder naar het front. In het derde systeem chloroform-methanol-water, 94:6:0,5 (v/v) bereikt aldosteron een  $R_f$ -waarde van 0,40. Deze laatste loopvloeistof werd eveneens ontleend aan BENNETT en HEFTMANN (1962).

Het scheidend vermogen van het totale chromatografie-systeem ten aanzien van aldosteron werd nagegaan door de loopsnelheid van een 45-tal steroïden te vergelijken met die van aldosteron.

De  $R$  aldosteron-waarden van deze steroïden zijn weergegeven in tabel VII. Aldosteron bleek van de meeste der onderzochte steroïden gescheiden te kunnen worden, met uitzondering van  $16\alpha$ -hydroxy-11-desoxycorticosteron,  $6\beta$ -hydroxy-11-dehydrocorticosteron en  $18$ -hydroxy-11-dehydrocorticosteron. Deze drie steroïden worden echter als acetaten gescheiden van aldosterondiacetaat.

Bij het opwerken van circa 200 urinemonsters bleek, dat in een klein aantal gevallen de intensiteit van de U.V.-licht absorberende "aldosteronzone" niet in overeenstemming was met de later berekende hoeveelheid aldosteron. In deze gevallen moet een, van aldosteron verschillende, U.V.-licht absorberende stof aanwezig zijn geweest op de aldosteronplaats.

Aangezien aldosteron met behulp van de bovenbeschreven chromato-

T a b e l VII

Raldosteron-waarden van een aantal steroiden  
in het chromatografie-systeem voor acetylering

4-Pregneen-11 $\beta$ ,21-diol-3,18,20-trion	Aldosteron *	1,00
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,21-triol-18,20-dion	Tetrahydro-aldosteron	0,77
4-Pregneen-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dion	Cortisol	1,49
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-20-on	Tetrahydrocortisol	1,22
5 $\alpha$ -Pregnaan-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dion	Dihydrocortisol-5 $\alpha$	1,51
5 $\beta$ -Pregnaan-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dion	Dihydrocortisol-5 $\beta$	1,48
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-pentol	$\beta$ -Cortol	0,22
4-Pregneen-17 $\alpha$ ,21-diol-3,20-dion	11-Desoxycortisol	2,17
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-20-on	Tetrahydro-11-desoxycortisol	1,34
4-Pregneen-17 $\alpha$ ,21-diol-3,11,20-trion	Cortison	1,76
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-11,20-dion	Tetrahydrocortison	1,20
5 $\alpha$ -Pregnaan-17 $\alpha$ ,21-diol-3,11,20-trion	Dihydrocortison-5 $\alpha$	1,84
5 $\beta$ -Pregnaan-17 $\alpha$ ,21-diol-3,11,20-trion	Dihydrocortison-5 $\beta$	1,45
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-tetrol-11-on	$\beta$ -Cortolon	0,24
4-Pregneen-11,21-diol-3,20-dion	Corticosteron	1,66
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,21-triol-20-on	Tetrahydrocorticosteron	1,24
4-Pregneen-21-ol-3,20-dion	Desoxycorticosteron	2,39
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,21-diol-20-on	Tetrahydrodesoxycorticosteron	1,73
4-Pregneen-19,21-diol-3,20-dion	19-Hydroxydesoxycorticosteron	1,56
4-Pregneen-6 $\beta$ ,21-diol-3,20-dion	6 $\beta$ -Hydroxydesoxycorticosteron	1,54
4-Pregneen-16 $\alpha$ ,21-diol-3,20-dion	16 $\alpha$ -Hydroxydesoxycorticosteron	1,10
4-Pregneen-21-ol-3,11,20-trion	11-Dehydrocorticosteron	2,05
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,21-diol-11,20-dion	Tetrahydro-11-dehydrocorticosteron	1,24
4-Pregneen-6 $\beta$ ,21-diol-3,11,20-trion	6 $\beta$ -Hydroxy-11-dehydrocorticosteron	1,10
4-Pregneen-18,21-diol-3,11,20-trion	18-Hydroxy-11-dehydrocorticosteron	1,11
4-Pregneen-3,20-dion	Progesteron	2,44
4-Pregneen-16 $\alpha$ -ol-3,20-dion	16 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	1,77
4-Pregneen-6 $\beta$ -ol-3,20-dion	6 $\beta$ -Hydroxyprogesteron	2,00
5-Pregneen-3 $\beta$ ,21-diol-20-on	21-Hydroxypregnenolon	1,72
5 $\alpha$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol	Pregnaandiol-5 $\alpha$	2,20
5 $\beta$ -Pregnaan-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol	Pregnaandiol-5 $\beta$	2,00
5 $\beta$ -Pregnaan-21-ol-3,20-dion		2,08
5-Pregneen-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol-20-on		2,12
5-Pregneen-3 $\beta$ -ol-20-on		2,24
5 $\alpha$ -Androstaan-3 $\alpha$ -ol-17-on	Androsteron	2,32
5-Androsteen-3 $\beta$ -ol-17-on	Dehydro-epiandrosteron	2,29
5 $\alpha$ -Androstaan-3 $\beta$ -ol-17-on		2,32
5-Androsteen-3 $\beta$ ,14 $\alpha$ -diol-17-on		1,88
4-Androsteen-3,17-dion		2,44
4-Androsteen-3,11,17-trion	Adrenosteron	2,39
4-Androsteen-11 $\beta$ -ol-3,17-dion		2,14
5 $\beta$ -Androstaan-3 $\alpha$ -ol-17-on	Etiocholanolon	2,22
1,3,5(10)-Estratrieen-3,17 $\beta$ -diol	Oestradiol-17 $\beta$	2,24
1,3,5(10)-Estratrieen-3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol	Oestriol	2,00
1,3,5(10)-Estratrieen-3-ol-17-on	Oestron	2,39

\* R<sub>F</sub>-waarde van aldosteron 0,40

De  $\Delta^4$ -3-oxo-steroiden werden gedetecteerd onder U.V.-licht, de andere steroiden door middel van jodiumdamp.

grafische procedure reeds in hoge mate is gezuiverd, brengt de zuivering van het daarna te vormen aldosterondiacetaat minder moeilijkheden met zich mee.

Bij de zuivering van het acetyleringsprodukt wordt in onze methode adsorptiechromatografie op silicagellagen afgewisseld met één verdeelingschromatogram op papier. Voor het papierchromatogram wordt achtereenvolgens gechromatografeerd op twee silicagellagen (in figuur 3 aangeduid met II en III), respectievelijk enkelvoudig in het systeem chloroform-aceton, 90:10 (v/v) en tweevoudig in de systemen ethylacetaat-dichloorethaan-water, 90:10:1 (v/v) en chloroform-aceton, 90:10 (v/v). De papierchromatografie wordt uitgevoerd in het systeem cyclohexaan-benzeen-methanol-water, 6:2:5:1 (v/v), gewijzigd naar KLIMAN en PETERSON (1960) (in figuur 3, IV). Na dit papierchromatogram

T a b e l VIII

R<sub>f</sub>-waarden van enkele steroiden na acetylering

	Chromatogram*			
	II	III	IV	V
Aldosterondiacetaat	0,55	0,73	0,62	0,58
Aldosteronmonoacetaat	0,25	0,73	0,37	0,40
Cortisolacetaat	0,20	0,77	0,24	0,41
Cortisonacetaat	0,37	0,80	0,27	0,49
Corticosteronacetaat	0,22		0,64	
18-Hydroxy-11-dehydrocorticosteronacetaat	0,30	0,58	1,00	0,39
6 $\beta$ -Hydroxy-11-dehydrocorticosteronacetaat	0,44	0,75	0,40	0,55
16 $\alpha$ -Hydroxy-11-desoxycorticosteronacetaat	0,76	0,86		0,61
Tetrahydrocortisolacetaat	0,85	0,98		0,71
Tetrahydrocortisonacetaat	0,98	0,96		0,77
Tetrahydrocorticosteronacetaat	0,75			
Aldosteron	0,05			
Cortisol	0,04			
Cortison	0,12			
Corticosteron	0,13			

\* De samenstelling van de daarbij toegepaste systemen is vermeld in tabel V.

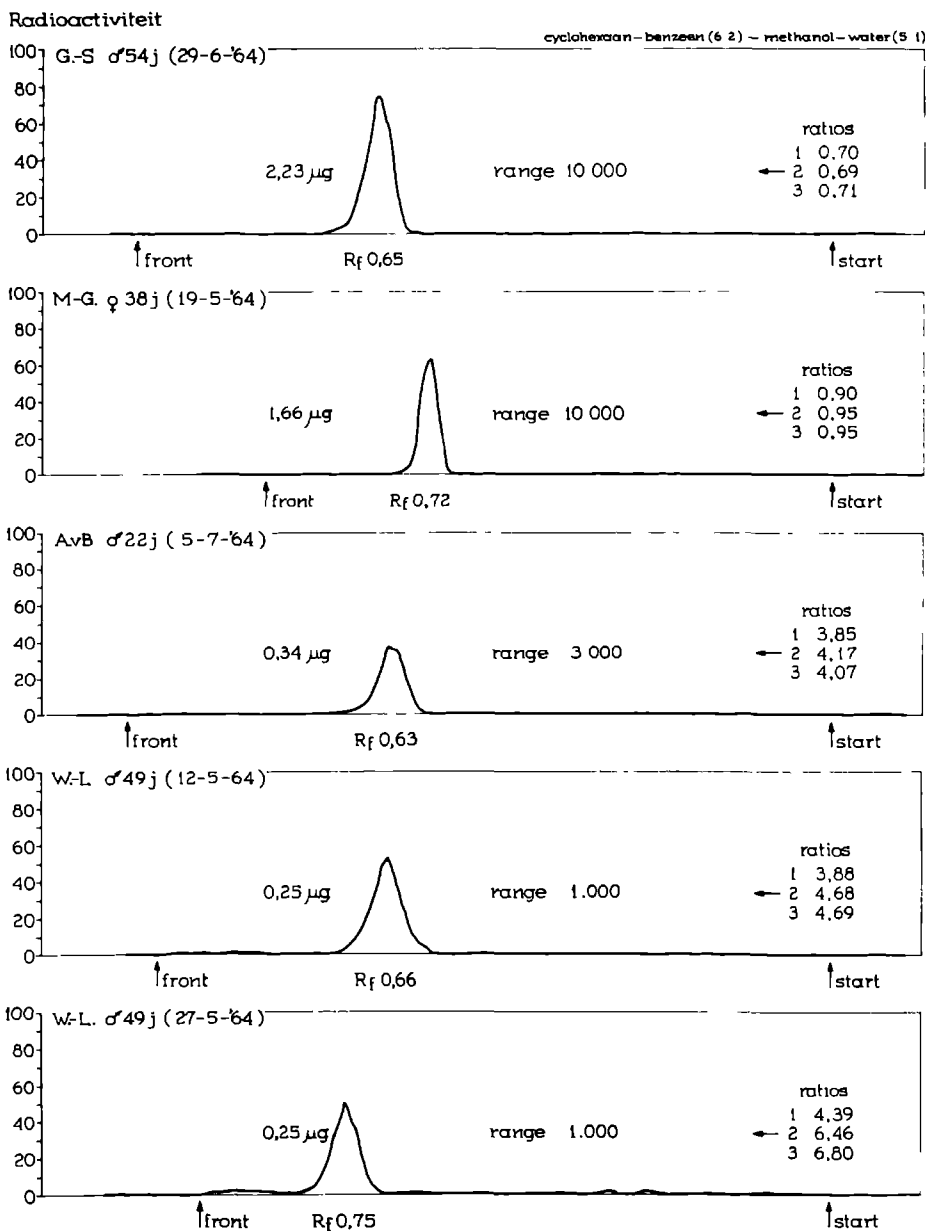


Fig.8. Radioactiviteitsverdeling over het papierchromatogram bijde bepaling van aldosteron in een vijftal urinemonsters  
De radioactiviteitspiek correspondeerde in alle gevallen met de U.V.-licht absorberende zône van aldosterondiacetaat



wordt tenslotte op een dunnelaag gechromatografeerd in het systeem benzeen-aceton-ethanol, 85:10:5 (v/v) (in figuur 3, V).

De  $R_f$ -waarden van een aantal steroidacetaten en vrije steroiden in de verschillende systemen zijn weergegeven in tabel VIII. Hierbij moge worden opgemerkt, dat reeds in het eerste systeem na acetylering (II) aldosterondiacetaat duidelijk van aldosteronmonoacetaat en van vrij aldosteron wordt gescheiden. Deze steroiden zullen voorkomen bij een onvolledige acetylering. Bovendien wordt aldosterondiacetaat in dit systeem gescheiden van de acetaten van de drie steroiden, die voor acetylering niet van het aldosteron werden gescheiden. De loopsnelheden van het aldosterondiacetaat en het aldosteronmonoacetaat ver-

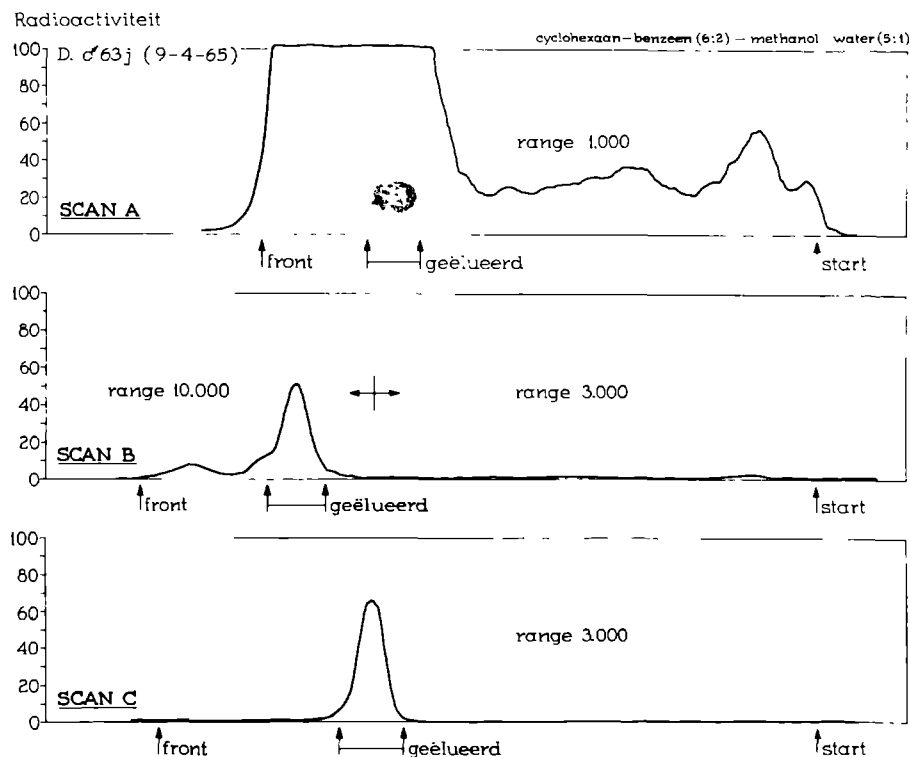


Fig.9. Effect van dunnelaagchromatografie op de zuiverheid van aldosterondiacetaat bij bepaling van aldosteron in urine

De "scans" werden vervaardigd na papierchromatografie

"Scan" A: het acetyleringsproduct werd direct op papier gechromatografeerd,

"Scan" B: het acetyleringsproduct werd, voorafgaande aan de papierchromatografie, gechromatografeerd op een dunnelaagchromatogram (figuur 3, chromatogram II),

"Scan" C: het acetyleringsproduct werd, voorafgaande aan de papierchromatografie, gechromatografeerd op twee dunnelagen, conform onze methode.

tonen onderling duidelijk grote verschillen in de systemen II en III.

Figuur 8 geeft een beeld van de zuiverheid van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat als resultaat van de chromatografische procedure voor en na de acetylering. De in deze figuur afgebeelde "scans" werden vervaardigd van papierchromatogrammen, die werden verkregen bij analyse van een vijftal urinemonsters. Buiten de plaats van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat werd weinig of geen radioactiviteit geregistreerd.

De effectieve zuivering, die door de dunnelaagsystemen na acetylering wordt bewerkstelligd, blijkt uit figuur 9. Bij de opwerking van een urinemonster werd na de gebruikelijke wassingen het acetylerings-

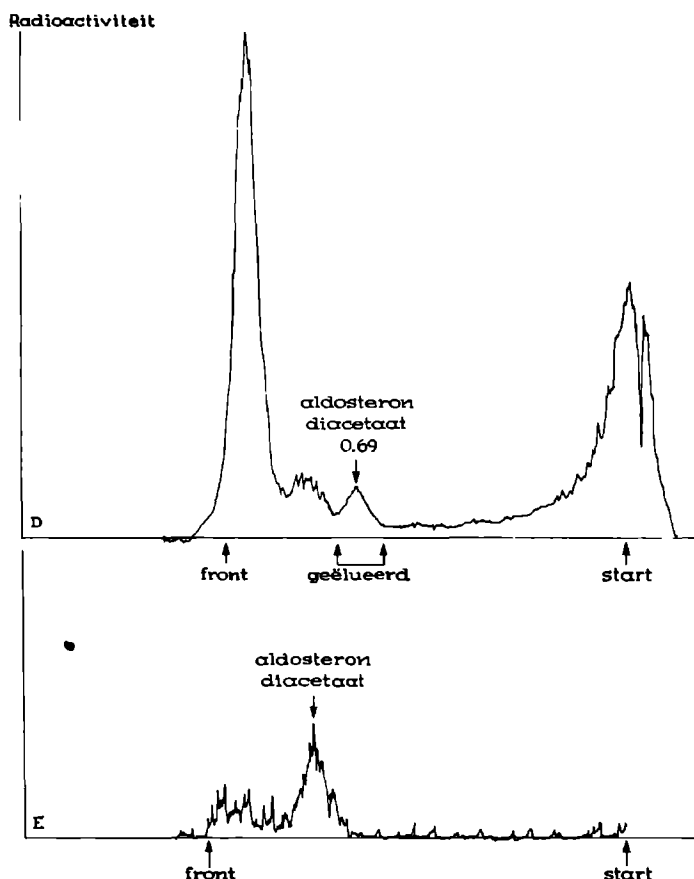


Fig.10. "Scans" van dunnelaagchromatogrammen bij bepaling van aldosteron in urine

"Scan" D: werd vervaardigd na chromatografie van het acetyleringsproduct (figuur 3, chromatogram II),

"Scan" E: werd vervaardigd na chromatografie van het eluaat van het dunnelaagchromatogram behorende bij "scan" D (figuur 3, chromatogram III).

produkt in drie porties verdeeld. Een deel werd direct op papier gechromatografeerd (scan A), een tweede deel werd voor de papierchromatografie op een dunnelaag gezuiverd (scan B) en het derde deel werd conform ons voorschrift gechromatografeerd (scan C). De "scans" tonen duidelijk aan, dat door inschakeling van één dunnelaagchromatogram de zuiverheid van het diacetaat in hoge mate is bevorderd. Dit blijkt tevens uit het verschil in de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van het eluaat behorend bij "scan" A en B (0,33 en 0,80). Bij toepassing van beide dunnelaagsystemen volgens ons voorschrift wordt een enkelvoudige, symmetrische radioactiviteitspiek verkregen (met een  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio gelijk aan 0,85).

Figuur 10 is andermaal een illustratie van de zuiveringscapaciteit van de gekozen dunnelaagsystemen. De "scans" in deze figuur geven de radioactiviteitsverdeling weer over de eerste dunnelaag (II) en over de tweede dunnelaag na beide "runs" (III). Ook hier blijkt (scan D), dat na acetylering het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat sterk verontreinigd is met nevenprodukten, die eveneens met  $^{14}\text{C}$  zijn gemerkt, ondanks de uitgebreide zuivering voor acetylering. Op het eerste dunnelaagchromatogram wordt aldosterondiacetaat reeds in aanzienlijke mate gezuiverd van deze nevenprodukten. Na het meervoudige systeem op de tweede dunnelaag is de specifieke  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit voor het grootste deel verwijderd (zie scan E).

Na de eerste zuivering van het vrije aldosteron op de dunnelaag geeft de combinatie van acetylering en adsorptiechromatografie op silicagel, afgewisseld met verdelingschromatografie op papier, een effectieve zuivering, zoals op de "scans" al is gedemonstreerd en in de volgende paragrafen nader zal blijken.

### § 3. ONTLEDING VAN ALDOSTERON TIJDENS DUNNELAAGCHROMATOGRAPHIE

Zoals reeds werd vermeld in hoofdstuk III, heeft NEHER (1964) gewezen op een mogelijke ontleding van aldosteron tijdens dunnelaagchromatografie op silicagellagen. Nadere gegevens omtrent de ontleding verstrekt deze onderzoeker niet. In een vroeger onderzoek van MATTOX en MASON (1956) werd vastgesteld, dat bij een langdurig contact met silicagel (5 dagen) cortisol en corticosteron voor circa 90% ontleden. Bij deze ontleding zou de ketolgroep aan koolstofatoom 17 geoxydeerd worden. Zij vermeldden niet of ook bij een kortstondig contact met silicagel een waarneembare ontleding optreedt. AYRES c.s. (1957) vonden bij chromatografie van hoeveelheden van 0,1 - 0,5  $\mu\text{g}$  aldosteron, cortisol of corticosteron op een silicagelkolom meer dan 95% van het steroid onveranderd terug.

Op de volgende wijze hebben wij onderzocht of aldosteron tijdens

chromatografie op lagen van silicagel ontleedt. Op de basislijn van een silicagellaag werd in zesvoud een mengsel opgebracht van 70  $\mu$ g aldosteron en 370.000 dpm  $^3\text{H}$ -aldosteron (aangeduid met vlekken 1 t/m 6). Bovendien werd boven het "loopvlak" hetzelfde mengsel in tweevoud opgebracht (aangeduid met 7 en 8). Vervolgens werd de plaat gechromatografeerd in het meervoudige systeem dat in onze procedure wordt gebruikt voor de acetylering (chromatogram I, figuur 3). De elutie van de vlekken geschiedde als volgt: (i) de vlekken 1 en 2, direct na de chromatografie; (ii) de vlekken 3 en 4, 17 uur na de chromatografie; (iii) de vlekken 5,6,7,8, vier dagen na de chromatografie. Na indampen van de eluaten werd gechromatografeerd op papier in het systeem cyclohexaanbenzeen-methanol-water, 5:10:10:4 (v/v). Een aldosteronmengsel, dat niet met silicagel in contact was geweest, diende als controle. Na de papierchromatografie werd de radioactiviteitsverdeling over het chromatogram gemeten.

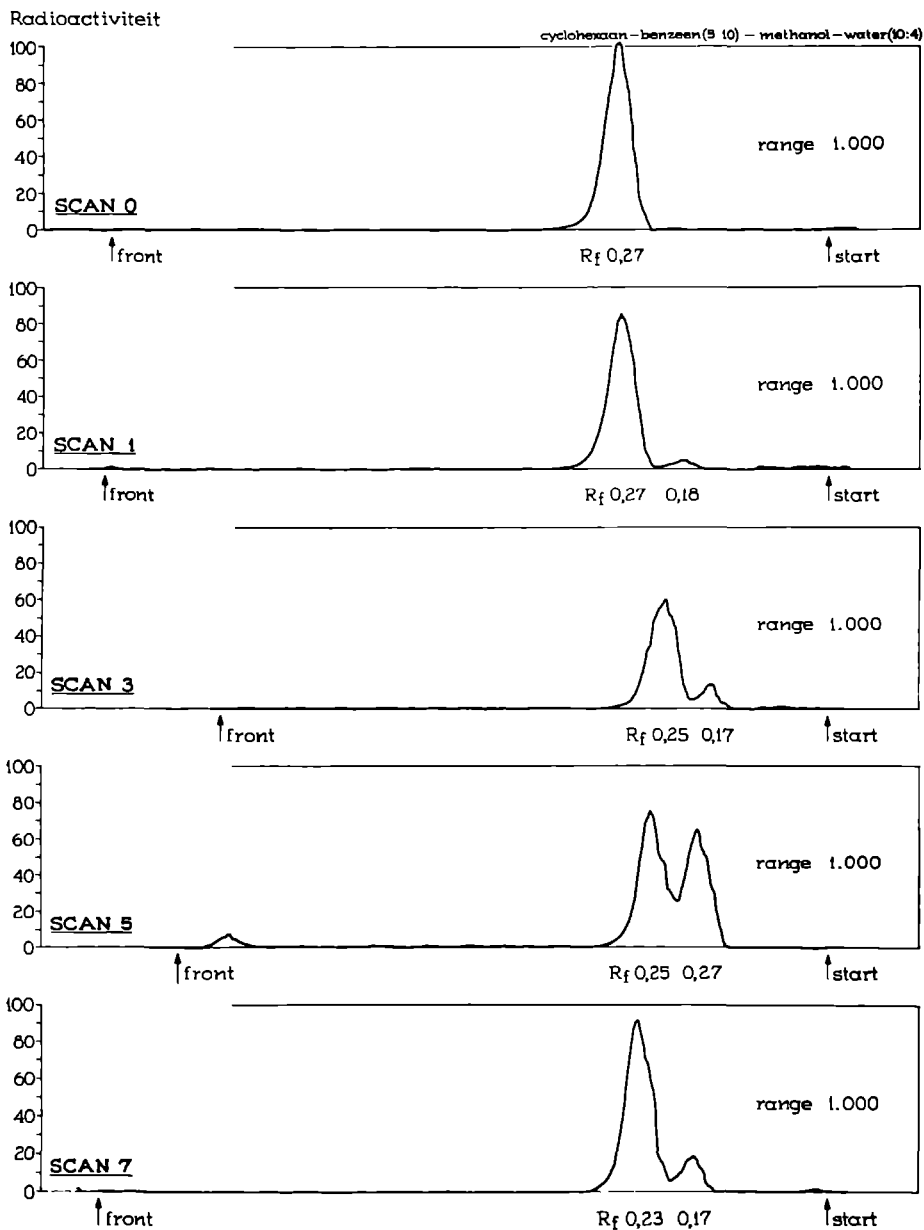
De "scans" weergegeven in figuur 11 illustreren duidelijk, dat naarmate het contact van aldosteron met silicagel langer duurt, een verder voortschrijdende ontleding van aldosteron optreedt. Naast de "aldosteronpiek" met een  $R_f$ -waarde van circa 0,27 wordt een tweede piek van radioactiviteit zichtbaar met een  $R_f$ -waarde van circa 0,17. Deze "ontledingspiek" wordt hoger, naarmate het contact met silicagel langer duurt.

De "ontledingspieken", die werden gevonden wanneer onmiddellijk na de dunnelaagchromatografie werd geëlueerd (vlekken 1 en 2), bevatten respectievelijk 5,7 en 4,8% van de radioactiviteit van de bijbehorende "aldosteronpiek". Na een contact van 17 uur en van vier dagen was dit percentage respectievelijk 20,1 (duplo 22,3) en 45,4 (duplo 45,0). Het aldosteron dat in tweevoud boven het loopvlak werd opgebracht bleek na 4 dagen aanzienlijk minder ontleed te zijn dan de monsters die wel werden gechromatografeerd. De "ontledingspiek" van het chromatogram bevatte 15,4% (duplo 15,9%). Dit verschil in ontleding kan samenhangen met de vergroting van het oppervlak waarover het aldosteron zich verdeelt tengevolge van de chromatografie.

Om na te gaan of het ontledingsproduct de bepaling in een later stadium zou kunnen storen werd de "ontledingspiek" van het chromatogram van vlek 5 (na 4 dagen contact) geacetyleerd met  $^{12}\text{C}$ -azijnzuuranhydride en gechromatografeerd volgens de gebruikelijke procedure. Op de aldosterondiacetaatplaats van het tweede dunnelaagchromatogram bleek geen meetbare hoeveelheid  $^3\text{H}$ -radioactiviteit aanwezig te zijn. Het ontledingsproduct wordt dus na acetylering in de daaropvolgende chromatografie-systemen van aldosterondiacetaat gescheiden.

Ter vergelijking werd het zojuist beschreven experiment, waarin relatief grote hoeveelheden aldosteron werden gechromatografeerd, herhaald met 370.000 dpm  $^3\text{H}$ -aldosteron (specifieke activiteit 100  $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ ) zonder toevoeging van ongemerkt aldosteron. In dit experiment is

per aldosteronvlek 2 nanogram aldosteron aanwezig. Het silicagel-opppervlak, waarover deze geringe hoeveelheid aldosteron zich verdeelt, zal relatief veel groter zijn dan wanneer tevens 70  $\mu$ g ongemerkt aldosteron aanwezig is. Geheel tegen onze verwachting in bleek de waar-



genomen ontleding minder groot dan in het eerder beschreven experiment, althans bij langduriger verblijf op de silicagellaag. Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn, dat de activiteit van de gebruikte silicagelagen niet gelijk geweest is.

De "ontledingspiek" bevatte bij onmiddellijke elutie 3,4% (duplo 4,1%) van de radioactiviteit van de "aldosteronpiek"; bij elutie na 17 uur bleek dit percentage 6,1 (duplo 8,5) en bij elutie na vier dagen 26,9 (duplo 32,6) te zijn.

T a b e l IX

Ontleding van aldosteron tijdens contact met een silicagellaag

	370.000 dpm $^3\text{H}$ -aldosteron + 70 $\mu\text{g}$ aldosteron	370.000 dpm $^3\text{H}$ -aldosteron
Contact alléén gedurende de chromatografie	5,3% *	3,8% *
Contact gedurende de chromatografie en 17 uur daarna	21,2%	7,3%
Contact gedurende de chromatografie en 96 uur daarna	45,2%	29,8%
Contact gedurende 96 uur zonder chromatografie	15,7%	29,2%

\* Radioactiviteit van de "ontledingspiek", uitgedrukt als percentage van de radioactiviteit van de "aldosteronpiek"; de percentages van duplo-bepalingen werden gemiddeld.

- ◀ Fig.11. Ontleding van aldosteron als gevolg van contact met silicagellagen
- "Scan" 0: papierchromatogram van een mengsel van  $^3\text{H}$ -aldosteron en niet gemerkt aldosteron zonder voorafgaand contact met silicagel,
- "Scan" 1: het mengsel werd na dunnelaagchromatografie (figuur 3, chromatogram I) direct geëluëerd en gechromatografeerd op papier,
- "Scan" 3: het mengsel verbleef na dunnelaagchromatografie gedurende 17 uur op de silicagellaag en werd gechromatografeerd op papier,
- "Scan" 5: het mengsel verbleef na dunnelaagchromatografie gedurende 4 dagen op de silicagellaag en werd vervolgens gechromatografeerd op papier,
- "Scan" 7: het mengsel werd op papier gechromatografeerd na een verblijf van vier dagen boven het loopvlak op de silicagellaag.

Het aldosteron, boven het loopvlak opgezet, bleek nu in gelijke mate te zijn ontleed, de "ontledingspiek" bevatte 26,4% (duplo 32,0%) van de "aldosteronpiek". Het is mogelijk, dat bij deze zeer kleine hoeveelheid aldosteron (2 nanogram) het silicagel-oppervlak, waarover het steroid zich bij het opbrengen verdeelt, reeds maximaal is en dat daardoor chromatografie geen verdere invloed heeft. De resultaten van deze experimenten betreffende de ontleding zijn samengevat in tabel IX, waarbij de gevonden duplowaarden zijn gemiddeld.

Eenzelfde "ontledingstest" werd uitgevoerd op  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat tijdens dunnelaagchromatografie. Uit de resultaten van deze experimenten bleek dat zelfs na 4 dagen contact met silicagel geen waarneembare ontleding van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat optreedt.

Uit de bovenvermelde resultaten blijkt dat aldosteron ontleedt wanneer het gedurende langere tijd met een silicagellaag in contact is. Wanneer een onnodig lang contact vermeden wordt door direct na de chromatografie te elueren, is de ontleding (circa 5%) echter alleszins aanvaardbaar. Bovendien wordt het meetresultaat van de bepaling niet beïnvloed door een dergelijke ontleding, aangezien het ontledingsproduct de verdere bepaling niet stoort en voor het eventuele verlies bij een dubbel-isotoop methode wordt gecorrigeerd.

#### § 4. DE ISOTOOPFRACTIONERING

De radiochemische zuiverheid van een stof na chromatografie wordt veelal getoetst door in opeenvolgende delen van de chromatografische vlek de specifieke activiteit te bepalen (UDENFRIEND 1950, AVIVI c.s. 1954, KLIMAN en PETERSON 1960, COPE 1964). Bij toepassing van een dubbel-isotoop methode behoeft voor de bepaling van de specifieke activiteit slechts de verhouding van de isotopen te worden gemeten. Als een constante verhouding gevonden wordt in alle delen van de vlek, is dit een aanwijzing voor de zuiverheid van de onderhavige stof.

Bij toepassing van dit zuiverheidscriterium werd door ons bij bepalingen van aldosteron in diverse urinemonsters, geen constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio over de vlek van het papierchromatogram gevonden. De vlek van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat \*) was klaarblijkelijk in elk van de onderzochte gevallen niet homogeen. Uitgaande van de startzijde werd in de opeenvolgende delen van de vlek een systematische daling van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio waargenomen.

Opmerkelijk was niet alleen dat dit fenomeen optrad in alle gevallen waarin de toets werd toegepast, maar ook dat het verloop in de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio steeds in dezelfde orde van grootte voorkwam. Bovendien bleek

\*) Onder  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat wordt verstaan een mengsel van  $^{14}\text{C}$  en  $^{12}\text{C}$ -diacetaaten van  $^3\text{H}$ - en  $^1\text{H}$ -aldosteron.

dat na papierchromatografie van zuiver  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat de vlek niet homogeen was. Eveneens werd waargenomen dat na chromatografie van een mengsel van zuiver  $^3\text{H}$ -aldosteron en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron het  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratioverloop in sterke mate aanwezig was. Uit deze bevindingen kon worden geconcludeerd, dat het verloop niet het gevolg was van radioactieve verontreinigingen, maar dat het verschijnsel berust op isotoopfractionering (BENRAAD en KLOPPENBORG 1965, BENRAAD c.s. 1966).

Het fenomeen van isotoopfractionering tijdens chromatografie van gemerkte steroïden werd voor het eerst signaleerd door JENSEN en JACOBSON (1962). Zij constateerden na papierchromatografie van een mengsel van zuiver  $^3\text{H}$ -oestradiol en  $^{14}\text{C}$ -oestradiol een variatie in de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio binnen de vlek. De  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -verhouding daalde systematisch uitgaande van de startzijde van de vlek. Nadien werd eenzelfde effect waargenomen bij chromatografie van verschillende steroïden en steroïdacetaten (KLEIN 1963, KLEIN c.s. 1964, TAIT 1964, ULICK c.s. 1964, KIRSCHNER en LIPSETT 1965, GOLD en CRIGLER 1966).

De eerste melding betreffende isotoopfractionering van dubbel gemerkt *aldosterondiacetaat* was een persoonlijke mededeling van LARAGH aan KLEIN (KLEIN 1963). TAIT (1964) merkte op, dat tijdens kolomverdelingschromatografie van getritieerd aldosteron de specifieke activiteit ( $^3\text{H}/\text{U.V.}$ -lichtabsorptie) van de opeenvolgende aldosteron bevattende fracties steeg. CEJKA en VENNEMAN (1965) namen eveneens een segregatie waar tussen  $^3\text{H}$ -aldosteron en ongemerkt aldosteron tijdens chromatografie over een verdelingskolom. Deze onderzoekers namen hetzelfde verschijnsel waar bij chromatografie van de  $^{12}\text{C}$ - of  $^{14}\text{C}$ -acetaten van voornoemde steroïden. CEJKA c.s. (1966) hebben in een uitvoerig onderzoek een invloed waargenomen van de stationaire fase van de verdelingskolom op de isotoopfractionering van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron evenals ook van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -cortison. LARAGH c.s. (1965) onderzochten het verschijnsel van isotoopfractionering bij kolomverdelingschromatografie en papierchromatografie van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat.

In alle genoemde onderzoekingen bleek dat de getritieerde steroïden een lagere loopsnelheid bezitten dan de desbetreffende ongemerkte of met  $^{14}\text{C}$  gemerkte steroïden. Als verklaring voor het fenomeen stelt ULICK (1964) dat mogelijk de stereochemische veranderingen van het molecuul, als gevolg van ingevoerde  $^3\text{H}$ -atomen, de loopsnelheid van het steroïd beïnvloeden.

Aangezien isotoopfractionering bij dubbel-isotoop methoden tot foutieve uitkomsten aanleiding zou kunnen geven, werd het hieronder beschreven onderzoek ingesteld.



$^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat werd bereid door mengsels van  $^3\text{H}$ -aldosteron en ongemerkt zuiver aldosteron te acetyleren met  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride en het acetyleringsprodukt te zuiveren volgens de methode beschreven in hoofdstuk IV. Als zuiverheidscriteria werden gehanteerd een enkelvoudige radioactiviteitspiek op het papierchromatogram en het constant zijn van de ratio's na de laatste twee chromatografische procedures. Op analoge wijze werden  $^1\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat en  $^1\text{H}$ -aldosteron- $^3\text{H}$ -diacetaat bereid en gezuiverd.  $^3\text{H}$ -aldosteron en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron werden met behulp van papierchromatografie gezuiverd; de afzonderlijke steroïden werden als zuiver beschouwd wanneer de "scan" een enkele piek vertoonde op de aldosteronplaats.

Bij het onderzoek naar isotoopfractionering werden de verschillend gemerkte aldosterondiacetaten op papier in het systeem cyclohexaan-benzeen-methanol-water, 6:2:5:1 (v/v), en op een dunnelaag in het systeem chloroform-aceton, 90:10 (v/v) gechromatografeerd.

Het mengsel van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron werd gechromatografeerd op papier in het systeem cyclohexaan-benzeen-methanol-water 5:10:10:4 (v/v) en op de dunnelaag in het meervoudige systeem dat in onze methode wordt gebruikt voor de acetylering.

Na papierchromatografie werd een "scan" vervaardigd en de U.V.-licht absorberende vlek op het chromatogram aangetekend. Vlek en piek corresponderden in alle gevallen. De vlek werd in zes tot acht opeenvolgende delen verdeeld, die afzonderlijk werden geelueerd. Na dunnelaagchromatografie werd de U.V.-licht absorberende vlek in zes tot negen delen geelueerd.

Het fenomeen van de isotoopfractionering werd bestudeerd na:

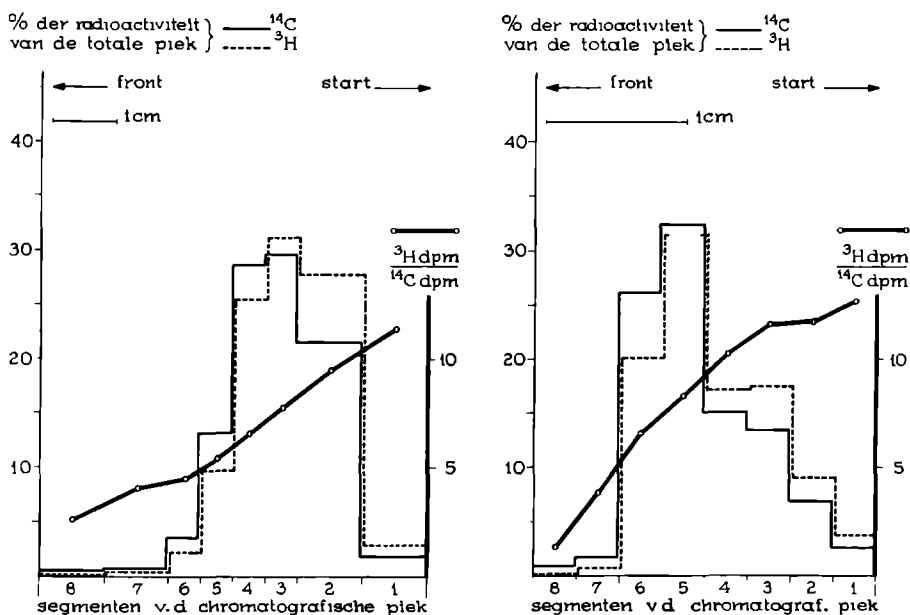
Papierchromatografie van

- a.  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat
- b. een mengsel van aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat en aldosteron- $^3\text{H}$ -diacetaat
- c. een mengsel van  $^3\text{H}$ -aldosteron en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron

Dunnelaagchromatografie van

- a.  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat
- b. een mengsel van  $^3\text{H}$ -aldosteron en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron.

Figuur 12 toont de verdeling van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit over een vlek die werd verkregen na papierchromatografie van zuiver  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat. Vanaf de startzijde van de vlek daalt de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio systematisch van circa 11 tot 4. In een zestal experimenten waarin zowel de hoeveelheid als de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat werden gevarieerd, werden waarden verkregen die zijn weergegeven in tabel X. De  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio blijkt in al deze experimenten in ongeveer gelijke mate te verlopen. De ratio van het eerste segment is steeds circa tweemaal die van het laatste segment. LARAGH c.s. (1965) namen bij papierchromatografie van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat een  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio-verloop waar van dezelfde grootte-orde (0,90 tot 0,50). Bij analyses van de aldosterondiacetaatvlekken, verkregen bij bepalingen van urinemonsters, werd eenzelfde verloop van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio waargenomen.



Bij papierchromatografie van een mengsel van aldosteron- $^3\text{H}$ -diacetaat en aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat treedt, althans in ons chromatografie-systeem, geen duidelijke scheiding op tussen de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit (zie tabel XI).

Bij papierchromatografie van een mengsel van  $^3\text{H}$ -aldosteron en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron is de segregatie tussen de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit aanzienlijk groter; de ratio van het eerste segment is gemiddeld zeven maal die van het laatste segment, zie figuur 13 en tabel XI.

Ook bij dunnelaagchromatografie van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat treedt een ratio-verloop op over de vlek, hoewel minder uitgesproken dan in het geval van papierchromatografie. De  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio daalt gemiddeld van 4,1 tot 3. Hierbij valt op dat vaak de ratio van het laatste segment hoger is dan die van het voorlaatste segment, zie figuur 14 en tabel XII. Een dergelijk verschijnsel werd ook door KIRSCHNER en LIPSETT (1965) waargenomen bij gaschromatografie van dubbel gemerkte acetaten van androgene hormonen.

T a b e l X

Isotoopfractionering tijdens papierchromatografie  
van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat

Experiment no.	1	2	3	4	5	6
dpm $^3\text{H}$ totale piek	26418	42668	223630	28302	329391	523942
dpm $^{14}\text{C}$ totale piek	16786	27803	138764	4032	44829	69885
$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio (dpm/dpm) van de totale piek	1,57	1,54	1,61	7,02	7,35	7,50
van segment 1	2,27	2,42	2,28	9,51	11,39	10,27
2	1,98	2,23	1,93	8,73	9,46	9,60
3	1,62	1,75	1,68	7,69	7,73	8,27
4	1,33	1,48	1,38	6,37	6,54	7,29
5	1,02	1,19	1,23	4,42	5,42	6,57
6	0,98	1,33	1,08	5,02	4,49	5,86
7	0,79		0,99		4,02	4,99
8					2,56	
Proximale ratio (1 t/m 4)*	1,67	1,68	1,71	7,74	7,85	8,27
Centrale ratio (3 en 4)	1,48	1,57	1,55	7,03	7,14	7,75
Distale ratio (3 t/m 6, 7 of 8)	1,39	1,46	1,46	6,80	6,66	7,06
$\Delta$ -proximale ratio **	+ 6,1%	+ 9,6%	+ 5,9%	+10,0%	+ 6,9%	+10,2%
$\Delta$ -centrale ratio	- 5,6%	+ 2,2%	- 3,9%	+ 1,9%	- 2,8%	+ 3,2%
$\Delta$ -distale ratio	-11,6%	- 5,2%	- 9,4%	- 3,0%	- 9,5%	- 5,8%

\* De proximale ratio is de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van de segmenten die zijn aangegeven met 1 t/m 4. De centrale ratio en distale ratio zijn analoog.

\*\* Met  $\Delta$ -proximale ratio wordt bedoeld het verschil tussen de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van de totale piek en de ratio van het proximale gedeelte van de piek, uitgedrukt als percentage van de ratio van de totale radioactiviteitspiek. De  $\Delta$ -centrale en de  $\Delta$ -distale ratio zijn analoog aan de  $\Delta$ -proximale ratio.

Mengsels van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron worden ook bij dunnelaagchromatografie in mindere mate van elkaar gescheiden dan bij papierchromatografie. De ratio's die hierbij werden gevonden, daalden van 7 tot 5, zie figuur 15 en tabel XII.

De isotoopfractionering heeft als praktische consequentie, dat het zuiverheidscriterium van een constante specifieke activiteit over een chromatografische vlek komt te vervallen. Een andere consequentie is, dat een fout kan worden geïntroduceerd wanneer niet een juist ge-

T a b e l   X I

Isotoopfractionering tijdens papierchromatografie  
van mengsels van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -diacetaten van ongemerkt aldosteron  
en van mengsels van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron

	$^3\text{H}$ -aldosteron $^{14}\text{C}$ -aldosteron		aldosteron- $^3\text{H}$ -diacetaat aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat		
Experiment no.	7	8	9	10	11
dpm $^3\text{H}$ totale piek	137120	73531	17831	20108	19131
dpm $^{14}\text{C}$ totale piek	38704	21604	16660	18022	17494
$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio (dpm/dpm) van de totale piek	3,54	3,40	1,07	1,12	1,09
van segment 1	5,05	5,12	1,19	1,26	1,33
2	4,67	4,80	1,15	1,15	1,15
3	4,64	3,87	1,09	1,09	1,15
4	4,07	3,11	1,03	1,11	1,07
5	3,34	1,65	1,05	1,08	1,02
6	2,73	1,33	1,01	1,02	0,98
7	1,54		0,98	1,17	1,11
8	0,55				
Proximale ratio (1 t/m 4)*	4,78	4,25	1,06	1,10	1,15
Centrale ratio (3 en 4)	3,57	3,49	1,09	1,13	1,18
Distale ratio (3 t/m 6, 7 of 8)	2,88	2,61	1,05	1,09	1,08
$\Delta$ -proximale ratio *	+34,8%	+24,9%	- 0,9%	- 1,3%	+ 4,8%
$\Delta$ -centrale ratio	+ 0,7%	- 2,6%	+ 1,9%	+ 1,3%	+ 7,5%
$\Delta$ -distale ratio	-19,0%	-23,2%	- 2,3%	- 2,2%	- 1,5%

\* Voor verklaring zie tabel X.

deelte van een chromatogram wordt geëluëerd. Deze fout wordt aan de hand van de tabellen X, XI en XII besproken. In deze tabellen zijn de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's vermeld van drie gedeelten van de chromatografische vlek:

- (i) van de middensegmenten, aangeduid als centrale ratio
- (ii) van de middensegmenten tezamen met de segmenten aan de start-zijde, de proximale ratio
- (iii) van de middensegmenten tezamen met de segmenten aan de front-zijde, de distale ratio.

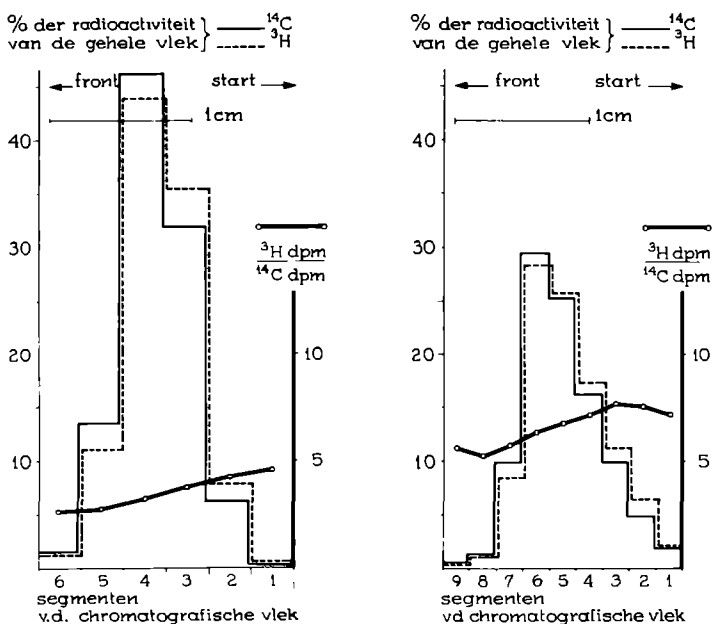


Fig.14. Isotoopfractionering tijdens dunnelaagchromatografie  
Verdeling van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit over de vlek  
na dunnelaagchromatografie van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat

Fig.15. Isotoopfractionering tijdens dunnelaagchromatografie  
Verdeling van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit over de vlek  
na dunnelaagchromatografie van een mengsel van  $^3\text{H}$ -aldosteron en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron

De afwijking van deze ratio's ten opzichte van de ratio van de vlek in zijn geheel, uitgedrukt als percentage van de laatstgenoemde ratio, wordt aangeduid als  $\Delta$ -ratio.

Uit de resultaten weergegeven in tabel XII blijkt, dat bij dunnelaagchromatografie slechts een geringe fout wordt geïntroduceerd wanneer een asymmetrisch gedeelte van de vlek wordt geëluëerd. In tegenstelling hiermee kunnen de proximale en distale ratio bij papierchromatografie in hoge mate afwijken van de ratio van de vlek in zijn geheel. Dit geldt met name voor de vlekken die worden verkregen bij papierchromatografie van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat en van mengsels van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron, waarin afwijkingen van respectievelijk 11 en 35% optreden (zie tabel X).

Op grond van de volgende gegevens menen wij te kunnen concluderen dat fractionering van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron de segregatie van  $^3\text{H}$ -aldosteron en ongemerkt aldosteron representeert. CEJKA en VENNEMAN (1965) en ook LARAGH c.s. (1965) namen tijdens kolomverdelingschromatografie een verregaande segregatie waar tussen  $^3\text{H}$ - en  $^1\text{H}$ -aldo-

T a b e l XII

Isotoopfractionering tijdens dunnelaagchromatografie  
van mengsels van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron en van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat

	$^3\text{H}$ -aldosteron $^{14}\text{C}$ -aldosteron		$^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat			
Experiment no.	1	2	3	4	5	6
dpm $^3\text{H}$ van de vlek in zijn geheel	107901	82038	396875	427494	511772	569299
dpm $^{14}\text{C}$ van de vlek in zijn geheel	16063	12720	118044	126632	154041	176060
$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van de vlek in zijn geheel	6,72	6,45	3,36	3,38	3,32	3,23
van segment * 1	7,17	6,82	4,52	4,55	4,43	4,51
2	7,56	7,17	4,19	4,22	3,96	4,05
3	7,66	7,06	3,72	3,74	3,49	3,46
4	7,11	7,28	3,21	3,21	3,04	3,06
5	6,80	6,67	2,80	2,77	2,65	2,64
6	6,36	6,41	3,19	2,64	4,38	4,57
7	5,69	5,83				
8	5,26	4,92				
9		5,10				
Proximale ratio**	(1 t/m 5) 7,11	(1 t/m 5) 6,93	(1 t/m 4) 3,50	(1 t/m 4) 3,49	(1 t/m 4) 3,37	(1 t/m 4) 3,32
Centrale ratio	(4 t/m 6) 6,69	(4 t/m 6) 6,70	(3 t/m 4) 3,42	(3 t/m 4) 3,42	(3 t/m 4) 3,25	(3 t/m 4) 3,24
Distale ratio	(4 t/m 8) 6,55	(4 t/m 9) 6,38	(3 t/m 6) 3,29	(3 t/m 6) 3,32	(3 t/m 6) 3,20	(3 t/m 6) 3,17
$\Delta$ -proximale ratio	5,8	7,4	4,1	3,2	1,5	2,7
$\Delta$ -centrale ratio	- 0,4	3,9	1,8	1,2	- 2,1	0,3
$\Delta$ -distale ratio	- 2,5	- 1,1	- 2,1	- 1,8	- 3,6	- 1,8

\* De segmentbreedte in de experimenten 1 en 2 was 2 mm, in de andere 3 mm.

\*\* Voor verklaring: zie onderschrift tabel X.

steron, terwijl CEJKA c.s. (1966) in een latere studie, gebruik makend van hetzelfde chromatografie-systeem, een fractionering van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron constateerden van vergelijkbare grootte. Uit de studie van GOLD en CRIGLER (1966) blijkt, dat ook bij papierchromatografie van steroiden als cortisol en cortolonen een invoering van  $^{14}\text{C}$  in het molecuul het chromatografisch gedrag niet verandert.

Uit de gegevens van tabellen X en XI is duidelijk, dat, wil men slechts een gedeelte van de vlek elueren om aanwezige verontreinigingen uit te sluiten, dit gedeelte een symmetrisch gedeelte moet zijn; anders wordt een aanzienlijke fout geïntroduceerd. Het is hierom van belang de plaats van het steroid op het chromatogram exact te localiseren. Voor  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat is dit om twee redenen veel eenvoudiger dan voor het vrije aldosteron. Het  $^{14}\text{C}$ -isotoop als sterkere  $\beta$ -straler is gevoeliger te detecteren met behulp van "scan"apparatuur. Bovendien kan na de acetylering ongemerkt aldosterondiacetaat worden toegevoegd aan het acetyleringsprodukt, waardoor detectie op een chromatogram mogelijk wordt door middel van U.V.-lichtabsorptie.

Een exacte localisatie van het vrije aldosteron wordt daarenboven nog bemoeilijkt, omdat verontreinigingen uit het extract invloed kunnen uitoefenen op de loopsnelheid van het steroid. Vergelijking met referentiesteroiden geeft dan geen volledige zekerheid omtrent de plaats van het aldosteron uit het extract. U.V.-lichtdetectie van aldosteron op een dunnelaag is circa tienmaal gevoeliger dan op een papierchromatogram en de isotoopfractionering is aanzienlijk geringer. De toepassing van dunnelaagchromatografie voor de zuivering van het vrije aldosteron in onze methode betekent daarom een verbetering vergeleken met de algemeen toegepaste papier- of kolomchromatografische zuivering (zie tabel III hoofdstuk III).

## § 5. DE $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -RATIO ALS CRITERIUM VOOR DE SPECIFICITEIT

In hoofdstuk III werd reeds opgemerkt dat de uiteindelijke meting bij dubbel-isotoop methoden geen intrinsieke specificiteit bezit. Daarom is het essentieel, dat bij iedere bepaling de zuivering van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat tijdens de procedure wordt beoordeeld door de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio te meten na de diverse zuiveringsstappen. Wanneer deze verhouding constant blijft na voortgezette chromatografie is dit een goede index voor de zuiverheid, wanneer tenminste het laatste chromatografie-systeem qua eigenschappen voldoende verschilt van het voorgaande. De in onze methode toegepaste afwisseling van adsorptiechromatografie (op een dunnelaag) en verdelingschromatografie (op papier) voldoet zeker aan deze eisen.

Bij 193 secretiesnelheidsmetingen van aldosteron werd het verschil berekend tussende  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio na de laatste en voorlaatste chroma-

T a b e l   XIII

De verandering van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio  
tengevolge van het laatste chromatogram

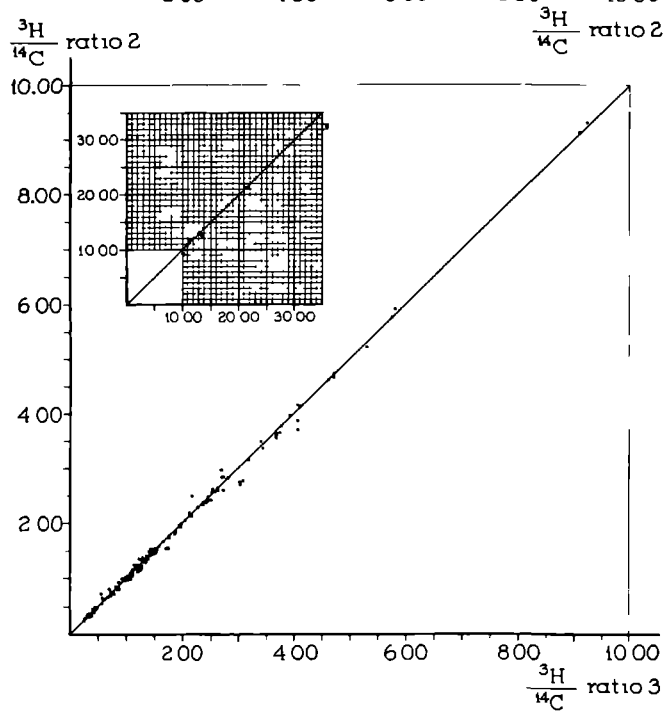
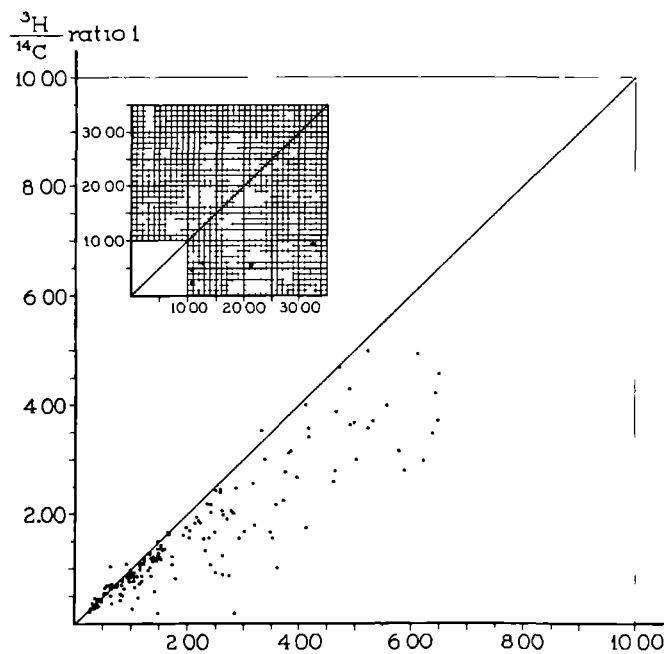
Aantal urine- monsters	Aldosteron- secretie in $\mu\text{g}/24$ uur	Algebraïsche gemiddelde van de $\Delta$ -ratio* in %	Standaard- deviatie van het algebraïsche gemiddelde
6	24 - 50	+ 4,6	$\pm$ 4,6
24	50 - 100	+ 4,0	$\pm$ 5,1
40	100 - 200	+ 2,7	$\pm$ 5,1
72	200 - 500	+ 1,6	$\pm$ 4,8
51	500 - 1800	+ 0,1	$\pm$ 5,1

\* $\Delta$ -ratio is het verschil tussen de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's na de voorlaatste en laatste chromatografie, uitgedrukt in procenten van de eerstgenoemde ratio.

tografie. Deze verschillen zijn in tabel XIII uitgedrukt als procentuele  $\Delta$ -ratio. Om na te gaan of er enig verband bestaat tussen de grootte van deze procentuele  $\Delta$ -ratio en de secretiesnelheid, werden de aldosteronwaarden gerangschikt in 5 groepen van opklimmende secretiewaarden. De gemiddelde procentuele  $\Delta$ -ratio neemt af van 4,6 tot 0,1 bij opklimmende secretiewaarden van aldosteron. Er bestaat dus een verband tussen de hoeveelheid aldosteron die voor de meting beschikbaar is en de zuiverheid van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat die bereikt wordt met behulp van de door ons gekozen chromatografie-systemen. De graad van zuiverheid bij de secretiesnelheden van 24 tot  $100\mu\text{g}$  blijkt reeds zeer bevredigend. Uit het algebraïsche gemiddelde (4,3%) en de standaarddeviatie (5) volgt, dat in 95% van de gevallen de verandering der  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio tengevolge van de laatste chromatografie varieert tussen -5 en +15%. Bij de hogere secretiewaarden is de graad van zuiverheid nog aanzienlijk hoger.

KLIMAN (1963) geeft een soortgelijke tabel waaruit blijkt, dat tengevolge van zijn vierde chromatografie-systeem een gemiddelde procentuele verandering van de berekende aldosteronwaarden optreedt van 18 tot 4% bij secretiewaarden van 10 tot  $100\mu\text{g}$ . Een vollediger vergelijking met deze methode is niet mogelijk omdat in de publikatie de standaarddeviatie niet is vermeld. In figuur 16 wordt van de 193 bepalingen de relatie weergegeven tussen de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's na drie stappen van de zuivering van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat. In de bovenste helft is op de ordinaat de ratio vóór papierchromatografie (ratio 1) afgezet





en op de abscis de ratio ná papierchromatografie (ratio 2). Slechts bij hoge secretiesnelheden, d.w.z. bij lage ratio's, wordt in een aantal gevallen reeds een constante waarde bereikt, terwijl bij hogere ratio's, ratio 2 steeds groter is dan ratio 1. In de onderste helft van de figuur is ratio 2 op de ordinaat afgezet en de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio na de laatste dunnelaagchromatografie (ratio 3) op de abscis. Bij hoge en bij lage ratio's blijkt een constante isotopenverhouding te zijn bereikt. Hiermee is geïllustreerd dat zowel bij lage als bij hoge aldosteronconcentraties het geïsoleerde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat in hoge mate zuiver is.

#### § 6. HYDROLYSE VAN $^3\text{H}$ -ALDOSTERON- $^{14}\text{C}$ -DIACETAAT TOT $^3\text{H}$ -ALDOSTERON- $^{14}\text{C}$ -MONOACETAAT ALS CRITERIUM VOOR DE SPECIFICITEIT

Voor de evaluatie van de methode was het van belang om naast het in de vorige paragraaf besproken zuiverheidscriterium te beschikken over een tweede controle op de zuiverheid van het geïsoleerde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat. Hiertoe werd gebruik gemaakt van een selectieve afsplitsing van de  $^{14}\text{C}$ -acetaatgroep aan koolstofatoom 18 en daaropvolgende zuivering van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat. De  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van het resulterende monoacetaat zal alleen dan het dubbele zijn van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van het diacetaat als laatstgenoemde verbinding voor de hydrolyse zuiver was. Deze tweede controle kan bevestigen of het zuiverheidscriterium, gebaseerd op een constante ratio, gefundeerd is. Bovendien kan voor de berekening van de excretie of secretie gebruik worden gemaakt van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van het monoacetaat als geen verdubbeling van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio heeft plaats gevonden.

De selectieve afsplitsing van de acetaatgroep aan koolstofatoom 18 kan bereikt worden door hydrolyse in zwak zuur milieu. In een onderzoek naar de optimale hydrolyse-omstandigheden werden de concentratie van het azijnzuur, de temperatuur en de tijdsduur gevarieerd. Het resultaat werd nagegaan door na de hydrolyse te chromatografieren in het systeem chloroform-aceton, 90:10 (v/v) en de intensiteit van de U.V.-licht absorberende vlekken van aldosterondiacetaat, aldosteronmonoacetaat en van vrij aldosteron te vergelijken. Na hydro-

---

Fig.16. Het constant blijven van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio als criterium van specificiteit bij bepaling van aldosteron in urine

◀ Boven: Relatie tussen  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio 1 en 2, respectievelijk voor en na papierchromatografie.

◀ Onder: Relatie tussen  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio 2 en 3, respectievelijk na papierchromatografie en na het laatste dunnelaagchromatogram.

Elk punt heeft betrekking op één van de in totaal 191 urinemonsters.

T a b e l   X I V

De  $\Delta$ -ratio en de hydrolyse-factor als criteria voor de specificiteit, toegepast op  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat geïsoleerd uit urine

$\Delta$ -ratio in %	Vóór hydrolyse $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - ratio	Ná hydrolyse			Hydrolyse- factor
		$^3\text{H}$ dpm	$^{14}\text{C}$ dpm	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - ratio	
3,7	1,11	2683	1158	2,32	2,09
- 2,0	5,80	7085	573	12,36	2,13
1,5	0,66	5086	3859	1,32	2,0
14,8	4,78	4391	442	9,93	2,08
1,9	0,88	6041	3278	1,84	2,09
0,0	1,98	4962	1253	3,96	2,00
0,5	3,76	4655	585	7,96	2,17
3,6	1,42	1672	513	3,26	2,29
2,5	1,21	2868	1106	2,59	2,14
- 0,3	2,62	3978	726	5,48	2,09
8,3	1,21	1944	743	2,62	2,17
1,0	1,02	8059	3714	2,17	2,14
6,3	0,18	786	1927	0,41	2,21
11,9	1,78	4966	1386	3,58	2,02
6,9	1,15	7873	3428	2,30	2,00
4,0	1,28	6283	2452	2,56	2,00
- 7,1	2,34	3958	823	4,81	2,06
4,2	1,73	4023	1187	3,39	1,96
3,5	6,66	6476	457	14,17	2,13
- 7,3	1,13	6949	2890	2,40	2,13
- 6,5	1,28	3970	1452	2,73	2,13
13,4	4,05	8141	962	8,46	2,09
3,3	2,05	5289	1288	4,18	2,04
0,0	3,13	3430	502	6,83	2,18
0,9	1,05	1468	654	2,24	2,14
3,2	1,64	1267	378	3,35	2,05
- 9,0	1,21	2826	1156	2,44	2,03
- 2,8	1,06	3059	1411	2,17	2,05
- 6,0	0,23	764	1608	0,47	2,11
- 5,5	0,25	955	1887	0,51	2,04
5,7	0,35	3869	5705	0,68	1,96
- 3,3	0,22	1212	2579	0,47	2,09
- 4,0	0,94	17716	9188	1,93	2,05
3,5	0,87	8319	4670	1,78	2,04
- 5,6	0,84	6858	3996	1,72	2,03
- 6,5	0,86	2495	1487	1,68	1,96

T a b e l XIV (vervolg)

$\Delta$ -ratio in %	Vóór hydrolyse $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - ratio	Ná hydrolyse			Hydrolyse- factor
		$^3\text{H}$ dpm	$^{14}\text{C}$ dpm	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - ratio	
- 2,3	0,82	18291	11088	1,65	2,00
8,5	0,76	7063	4988	1,42	1,87
- 1,3	0,74	7513	5062	1,48	2,00
- 1,3	0,74	4474	3053	1,47	1,97
2,7	3,68	14913	1923	7,76	2,11
- 0,6	1,58	2965	898	3,30	2,09
0,0	0,75	2817	1664	1,69	2,24
6,1	0,69	2962	1935	1,53	2,23
0,0	1,50	4916	1491	3,30	2,21
2,8	2,56	5345	1026	5,21	2,03
4,0	3,82	10185	1334	7,63	2,00
1,2	gemiddeld			gemiddeld	2,08
5,5	S.D.			S.D.	0,09
-12,8	2,18	1820	305	5,97	2,74
5,9	6,23	3471	226	15,36	2,47
39,2	14,07	6250	154	40,58	2,88
23,5	27,79	1678	43	39,02	1,40
- 2,8	7,63	3858	323	11,94	1,57
11,7	4,76	1067	81	13,20	2,77
8,1	7,36	2736	130	21,00	2,85
10,2	1,74	946	231	4,10	2,36
-26,8	3,44	1429	172	8,31	2,41
6,2	gemiddeld			gemiddeld	2,38
19,3	S.D.			S.D.	0,55

lyse in 1 M azijnzuur bij 60°C gedurende 4 uur kwam op het chromatogram nog slechts de vlek voor van aldosteronmonoacetaat. Onder die omstandigheden verloopt de beoogde hydrolyse nagenoeg volledig. Ter nadere controle werd het hydrolyse-produkt na dunnelaagchromatografie gechromatografeerd op papier in het systeem cyclohexaan-benzeen-methanol-water, 6:2:5:1 (v/v). Bij "scannen" van dit chromatogram werd slechts één symmetrische piek van radioactiviteit geregistreerd met een  $R_f$ -waarde overeenkomend met die van authentiek aldosteronmonoacetaat. Als gemiddelde opbrengst van de hydrolyse en daaropvolgende dunnelaagchromatografie werd steeds circa 70% gevonden.

T a b e l   X V

De  $\Delta$ -ratio en de hydrolyse-factor als criteria voor de specificiteit, toegepast op zuiver  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat

$\Delta$ -ratio in %	Vóór hydrolyse $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - ratio	Ná hydrolyse			Hydrolyse- factor
		$^3\text{H}$ dpm	$^{14}\text{C}$ dpm	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ - ratio	
- 2,9	1,62	7401	2275	3,25	2,00
1,8	1,67	36876	11217	3,29	1,97
3,4	4,06	87611	11389	7,69	1,92
2,5	3,11	6450	1075	6,00	1,93
1,2	4,53	8860	1018	8,70	1,92
- 3,2	3,07	63445	10692	5,93	1,94
- 2,9	1,76	18016	4995	3,61	2,05
3,2	1,61	14883	4195	3,55	2,21
0,4	gemiddeld			gemiddeld	1,99
2,9	S.D.				S.D. 0,10

De vorming van het aldosteronmonoacetaat werd als zuiverheids-criterium toegepast bij de bepaling van 56 urinemonsters; de resultaten zijn weergegeven in tabel XIV. In de tabel zijn twee zuiverheids-criteria opgenomen: de  $\Delta$ -ratio, waaruit het constant blijven van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio moet blijken en de hydrolyse-factor, waaronder wordt verstaan het quotiënt van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's ná en vóór de hydrolyse tot het monoacetaat (theoretisch moet deze dus 2,00 bedragen). Bovendien zijn in deze tabel opgenomen de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio voor en na de hydrolyse en het aantal dpm  $^3\text{H}$  en  $^{14}\text{C}$  dat ná de hydrolyse werd gemeten. In 47 gevallen was de afwijking van de hydrolyse-factor kleiner dan 15%. Het gemiddelde van deze 47 hydrolyse-factoren is 2,08 met een standaarddeviatie van 0,09. Dit gegeven duidt er wel zeer sterk op, dat met onze methode een hoge graad van zuiverheid van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat wordt bereikt. In dezelfde reeks van bepalingen werd vóór de hydrolyse een gemiddelde  $\Delta$ -ratio gevonden van 1,2% met een standaarddeviatie van 5,5. Vergelijking van beide criteria van zuiverheid laat zien dat de hoge graad van zuiverheid die door de  $\Delta$ -ratio wordt aangegeven volkomen wordt bevestigd door de hydrolyse-factor.

Bij negen urinemonsters werd een afwijking van de theoretische hydrolyse-factor waargenomen groter dan 15%. In al deze gevallen is de gemeten hoeveelheid  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit geringer dan in de eerder genoemde reeks. De gevonden gemiddelde  $\Delta$ -ratio, 6,2% (S.D. 19,3), gaat hier samen met een hydrolyse-factor van 2,38 (S.D. 0,55). Bij verge-

lijking van de afzonderlijke waarden van de negen bepalingen blijkt, dat bij lage  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit de constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio geen specificiteit garandeert. In zeven van deze negen bepalingen was de hydrolyse-factor groter dan 2,00. Dit duidt er op, dat er in die gevallen voor de hydrolyse relatief veel specifieke  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit aanwezig is geweest. Het is duidelijk, dat de blancowaarde van de bepaling hier invloed doet gelden (zie 5.7).

Ter vergelijking werd in een aantal experimenten zuiver  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat gehydrolyseerd tot het monoacetaat. Het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat werd verkregen door zuiver aldosteron na toevoeging van  $^3\text{H}$ -aldosteron te acetyleren met  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride. De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in tabel XV. De  $\Delta$ -ratio bedroeg hier gemiddeld 0,4% (S.D. 2,9) en de hydrolyse-factor was gemiddeld 1,99 (S.D. 0,10).

## § 7. DE TERUGWINNING VAN DE TRACER IN DE VERSCHILLENDE STAPPEN VAN DE BEPALING

Het rendement van de zuivering kan een factor zijn, die de gevoeligheid van de methode bepaalt. Daarom werd in een aantal experimenten de opbrengst van  $^3\text{H}$ -aldosteron nagegaan in de verschillende stappen van de bepaling, toegepast op urinemonsters. De resultaten hiervan zijn samengevat in tabel XVI. De gemiddelde opbrengst van de hydrolyse ende daaropvolgende extractie en wassingen bedroeg 92%. De opbrengst van de meervoudige dunnelaagchromatografie was 71% en verschilde niet van de overeenkomstige opbrengst bij chromatografie van zuiver  $^3\text{H}$ -aldosteron. Dit wijst er op, dat de chromatografie niet gestoord wordt door in het extract aanwezige verontreinigingen.

Acetylering tezamen met de daaropvolgende dunnelaagsystemen gaf een opbrengst van gemiddeld 62%. De opbrengsten van de drie stappen werden afzonderlijk nagegaan en zijn weergegeven in tabel XVII. Deze bedroegen gemiddeld respectievelijk 92, 82 en 90% met een "overall recovery" van 68%. Ook de gemiddelde waarden voor de opbrengst van de papierchromatografie en de laatste dunnelaagchromatografie (respectievelijk 83 en 87%) zijn in overeenstemming met de daarvoor te verwachten waarden.

Uit de gemiddelde percentages volgt een "overall recovery" van 29%, een waarde die aanzienlijk hoger ligt dan de waarde van 7 - 16%, welke bij de methode volgens KLIMAN en PETERSON wordt gevonden (KLIMAN en PETERSON 1960, NEWC. S. 1966). Daar de boven aangegeven opbrengsten van de diverse stappen ongeveer zo hoog zijn als redelijkerwijs verwacht mag worden, lijkt het onwaarschijnlijk, dat deze "overall recovery" nog aanzienlijk kan worden verhoogd. Tijdens de gang van de analyse wordt ongeveer 50% van het aanwezige aldosteron

T a b e l XVI

Terugwinning van de tracer in de verschillende stappen der bepaling,  
uitgevoerd op urinemonsters \*

										Ge- mid- deld	S.D.
Hydrolyse en daar- opvolgende extrac- tie	89,2 95,9 93,3	92,0 95,9 82,6	84,6 93,6 89,6	89,3 89,2 94,5	91,2 94,2 94,5	92,6 101,0 90,5	94,7 93,3 96,6	82,7 96,0 84,6		91,7	4,6
Meervoudige dunne- laagchromatografie (I) voor acetylering	76,4 75,9 73,8	75,6 70,3 80,0	69,8 72,2 84,8	69,6 67,6 70,0	68,7 65,8 70,7	73,0 66,8 62,6	72,2 69,5 71,1	65,6 70,0 70,5		71,4	4,8
Acetylering en daaropvolgende dunnelaagchroma- tografie (II en III)	58,3 67,5 62,3	56,3 61,2 51,0	62,5 60,7 64,6	61,0 53,5 56,7	58,6 77,4 42,9	51,9 62,4 67,6	70,1 65,6 65,5	66,2 73,7 68,9		61,9	7,7
Papierchromato- grafie (IV)	79,0 85,0 96,8	81,8 80,9 90,5	57,5 88,5 84,1	85,5 79,4 82,9	83,9 75,0 95,0	87,6 62,0 86,0	72,7 92,1 90,0	65,3 89,1 91,1		82,6	10,0
Dunnelaagchroma- tografie (V)	91,4 92,7 75,7	90,1 100,0 90,3	88,1 88,2 80,5	74,9 84,5 85,1	89,9 84,7 93,5	91,5 89,8 98,0	53,3 86,9 87,4	81,0 94,0 87,9		86,6	9,3
"Overall recovery"										29,0%	

\* als percentage van de vóór elke stap aanwezige  $^3\text{H}$ -radioactiviteit

T a b e l XVII

Terugwinning van de tracer na acetylering  
en na de twee daarop volgende dunnelaagchromatogrammen \*

										Ge- mid- deld
Acetylering **	90,0	92,0	94,3	92,8	94,7	91,2	92,9	91,3		92
Dunnelaag- chromatografie (II)	78,2	84,3	81,7	83,0	87,1	85,1	86,6	73,6		82
Dunnelaagchroma- tografie (III <sup>1,2</sup> )	95,1	83,0	92,3	90,6	92,8	89,5	88,8	90,2		90
"Overall recovery"										68%

\* als percentage van de vóór elke stap aanwezige  $^3\text{H}$ -radioactiviteit.

\*\*  $^3\text{H}$ -aldosteron werd geacetyleerd met  $^{12}\text{C}$ -azijnzuuranhydride.

(diacetaat) gebruikt voor radioactiviteitsmetingen. Dientengevolge zal voor de uiteindelijke meting geen 29% doch 15% beschikbaar zijn.

Wanneer aan een bepaling van aldosteron in urine de eis wordt gesteld van een onderste gevoeligheidsgrens van  $1 \mu\text{g}/24\text{-uurs urine}$ , dan leert de volgende berekening, dat de bovenvermelde "overall recovery" daartoe voldoende hoog is. In onze methode wordt uitgegaan van  $1/5$  gedeelte van de 24-uurs urine en bedraagt de specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride  $2 \text{ mC}/\text{mmol}$ . Wanneer in een 24-uurs urine  $1 \mu\text{g}$  aanwezig is, betekent dit dat  $0,2 \mu\text{g}$  moet worden bepaald. Voor de uiteindelijke meting is dan  $0,03 \mu\text{g}$  aldosteron ter beschikking. Dit komt overeen met 375 dpm  $^{14}\text{C}$  ofwel 225 cpm bij een efficiency van 60% in het gebruikte kanaal. De blancowaarde van de  $^{14}\text{C}$ -telling bedraagt 20 cpm. Als maatstaf voor een nauwkeurige radioactiviteitsmeting geldt dat het aantal cpm tenminste het vijfvoudige van de blanco moet bedragen. Duidelijk blijkt dus, dat de "overall recovery" niet limiterend is voor de gestelde onderste gevoeligheidsgrens der bepaling. De "overall recovery" laat bij de gekozen specifieke activiteit van  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride van  $2 \text{ mC}/\text{mmol}$  een meting toe van  $0,4 \mu\text{g}/24\text{-uurs urine}$ .

## § 8. DE BLANCOWAARDE VAN DE BEPALING

Bijeengegeven specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride wordt de onderste gevoeligheidsgrens van de bepaling in principe door de "overall recovery" en de blancowaarde bepaald. Uit de gegevens van § 7 blijkt dat de "overall recovery" 29% bedraagt en niet limiterend is voor de gestelde onderste gevoeligheidsgrens van  $1 \mu\text{g}/24\text{-uurs urine}$ .

De gegevens in de literatuur over de blancowaarde van de diverse bepalingen zijn zeer vaag (COGHLAN c.s. 1965, NEW c.s. 1966). De blancowaarde is voor ieder urinemonster niet exact vast te stellen. Om er toch een indruk van te krijgen werd de bepaling uitgevoerd op eendrietal porties gedestilleerd water en op een zestal urinemonsters van bijnierloze patiënten. Een directe maat voor de blancowaarde is de hoeveelheid  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit die aanwezig is op de plaats waar anders het aldosterondiacetaat op het papierchromatogram zou zijn gelocaliseerd. De blancowaarde werd in dat stadium van de bepaling gemeten omdat de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio na de papierchromatografie reeds de juiste waarde dient te hebben.

In tabel XVIII zijn de resultaten van de blanco-experimenten opgenomen. De blancowaarde is uitgedrukt in het aantal dpm  $^{14}\text{C}$  aanwezig op de aldosterondiacetaatplaats van het papierchromatogram. Tevens is deze  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit uitgedrukt in  $\mu\text{g}$  aldosteron. Bij opwerken van drie porties gedestilleerd water werd een gemiddelde blancowaarde van  $0,013 \mu\text{g}$  gevonden. Bij opwerken van zes urinemonsters, ter grootte van  $1/5$  deel van de 24-uurs produktie van bijnierloze proefpersonen,



T a b e l   XVIII  
Blancowaarde van de bepaling

Vloeistof	Hoeveelheid in ml	Blanco op de aldosterondiacetaat- plaats van het papierchromatogram	
		dpm $^{14}\text{C}$	equivalent aan $\mu\text{g}$ aldosteron *
Water	200	150	0,012
	150	131	0,013
	150	143	0,014
Urine van bijnierloze patiënten	470	125	0,010
	200	150	0,012
	400	332	0,027
	385	520	0,042
	400	223	0,018
	550	225	0,018

\* Bij de gebruikte specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride komt 12,500 dpm  $^{14}\text{C}$  overeen met 1  $\mu\text{g}$  aldosteron.

werd een gemiddelde blancowaarde gemeten van circa 0,02  $\mu\text{g}$ . De gelijke grootte-orde van deze twee gemiddelde blancowaarden duidt er sterk op, dat voor bepalingen in urinemonsters met een dergelijke blancowaarde rekening gehouden moet worden.

Bij een bepaling kan voor de blancowaarde worden gecorrigeerd door voorafgaande aan de berekeningen van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio na de papierchromatografie de specifieke  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit in mindering te brengen.

De gemiddelde opbrengst van de bepaling tot en met de papierchromatografie, berekend uit de gegevens van tabel XVI, is 33%. Per 1/5 gedeelte van de 24-uurs urine wordt dus  $3 \times 0,02 = 0,06 \mu\text{g}$  aldosteron te veel gevonden. Indien de correctie niet wordt aangebracht, zal de berekende aldosteronwaarde 0,3  $\mu\text{g}/24$ -uurs urine te hoog zijn. Bij deze blancowaarde van 0,3  $\mu\text{g}/24$ -uurs urine zal de onderste gevoeligheidsgrens 0,6  $\mu\text{g}/24$ -uurs urine bedragen.

## § 9. DE REPRODUCEERBAARHEID VAN DE BEPALING

Het gebruik van een verliesindicator heeft tot gevolg, dat noch verliezen die tijdens de procedure optreden, noch variaties in de opbrengsten van de bij de methode toegepaste reacties de reproduceerbaarheid

T a b e l    X I X

Reproduceerbaarheid van de meting, uitgevoerd op urinemonsters

Urinemonster	Secretie aldosteron in $\mu\text{g}/24$ uur
1	661
	661
	643
2	571
	563
	544
3	322
	307
4	412
	361
5	428
	375
6	460
	423
	S = 22

S = standaardafwijking binnen de groepen

$$S = \sqrt{\frac{\text{SSD}_1 + \dots \text{SSD}_n}{\text{aantal waarnemingen} - \text{aantal groepen}}}$$

waarin  $\text{SSD}_n = (x - \bar{x})^2$  in n<sup>de</sup> groep etc.  
 $\bar{x}$  = groepsgemiddelde  
 $x$  = individuele meetwaarde

beïnvloeden. De reproduceerbaarheid van de dubbel-isotoop methode zal dan ook voornamelijk worden bepaald door de reproduceerbaarheid van de chromatografische zuivering en de radioactiviteitsmeting. De reproduceerbaarheid van de chromatografische zuivering hangt sterk af van de aard en de hoeveelheid van de aanwezige verontreinigingen en, zoals we bij de bespreking van de isotoopfractionering zagen, van elutie van het juiste gedeelte van het chromatogram. De reproduceerbaarheid van de bepaling werd getoetst door een zestal urinemonsters in meer-voud op te werken. De resultaten zijn samengevat in tabel XIX. Als maat voor de reproduceerbaarheid werd de standaardafwijking berekend binnen de groepen zoals deze in de enkelvoudige variantie-analyse wordt gegeven (zie bijvoorbeeld DIXON en MASSEY 1957). Bij ongeveer nor-

T a b e l   XX

Reproduceerbaarheid van de meting, uitgevoerd op zuiver aldosteron

$\mu\text{g}$ aldosteron aanwezig	$\mu\text{g}$ aldosteron gevonden
10,86	10,4 10,6 10,4 S.D. = 0,12
3,62	3,2 3,8 3,7 3,7 3,4 S.D. = 0,25

maal verdeelde grootheden betekent de gevonden standaardafwijking van 22, dat tenminste 90% van de waarnemingen niet meer dan 44 zal afwijken van het ware gemiddelde van de groep. Wanneer deze standaardafwijking wordt uitgedrukt in procenten van het meetresultaat varieert zij van 3,3 (monster 1) tot 6,9 (monster 3).

Ter vergelijking werden meervoudige bepalingen uitgevoerd op zuiver aldosteron in hoeveelheden van 10,86 en 3,63  $\mu\text{g}$  (tabel XX). De standaarddeviatie van de twee groepen bedroeg bij deze experimenten respectievelijk 0,12 en 0,25. In procenten van het meetresultaat uitgedrukt is de standaarddeviatie voor de grootste hoeveelheid 1,1 en voor de kleinste 7,0.

Wanneer een bepaling reproduceerbaar is, betekent dit niet, dat deze ook vrij is van systematische fouten. Een systematische fout zou kunnen worden veroorzaakt door aspecificiteit tengevolge van onvoldoende zuivering, of door een niet juist bepaalde specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride. In onze methode wordt de zuivering bij elke bepaling gecontroleerd en de specifieke activiteit op twee verschillende manieren bepaald. Om deze redenen geven de bovengenoemde standaardafwijkingen niet alleen een beeld van de reproduceerbaarheid, maar eveneens een indruk van de nauwkeurigheid van de methode.

Na het ter perse gaan van deze dissertatie werden de resultaten bekend van herhaalde metingen aan nog twee urinemonsters. Terwijl voor de bovenbesproken experimenten urinemonsters werden opgewerkt met betrekkelijk hoge aldosteronconcentraties waren de concentraties van deze twee urines laag. De duplo's van de metingen bedroegen 55 en 57 voor de eerste en 22 en 35  $\mu\text{g}/24$  uur voor de tweede meting.

# § 10. DE NAUWKEURIGHEID VAN DE METING DER SPECIFIEKE ACTIVITEIT VAN $^{14}\text{C}$ -AZIJNZUURANHYDRIDE

De nauwkeurigheid waarmee de  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit kan worden herleid tot gewichtshoeveelheden aldosteron is afhankelijk van de nauwkeurigheid waarmee de specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride is bepaald.

In 4.7 is beschreven op welke wijze de specifieke activiteit van  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride bepaald kan worden met behulp van cortisol. Bij die methode wordt na acetylering en de daaropvolgende zuivering van het  $^{14}\text{C}$ -cortisolacetaat de gewichtshoeveelheid fluorimetrisch bepaald en de  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit wordt op de gebruikelijke wijze gemeten. De specifieke activiteit kan berekend worden uit de resultaten van deze twee metingen. Om een indruk te krijgen van de nauwkeurigheid van de specifieke activiteitsbepaling werden bekende hoeveelheden zuiver aldosteron na toevoeging van  $^3\text{H}$ -aldosteron geacetyleerd met de diverse "batches"  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride. Het gevormde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -

T a b e l   X X I

De specifieke activiteit van  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride,  
bepaald met behulp van twee verschillende methoden

"Batch" $^{14}\text{C}$ -azijnzuur- anhydride	Specifieke activiteit in mC/mmol		
	bepaald m.b.v. cortisol	bepaald m.b.v. aldosteron	Vershil in %*
1	2,02	1,90	+ 6,0
2	1,90	1,88	+ 1,0
3	1,72	1,64	+ 4,7
4	2,03	1,97	+ 3,0
5	1,51	1,56	- 3,3
6	1,83	1,88	- 2,7
7	1,67	1,57	+ 5,8
			gem. + 2,1 S.E.    1,5 p =    0,20

\*  $\frac{\text{waarde m.b.v. cortisol} - \text{waarde m.b.v. aldosteron}}{\text{waarde m.b.v. cortisol}} \times 100$

diacetaat werd op de in 4.7 beschreven wijze gezuiverd tot een constante  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio. In de vergelijking:

aantal  $\mu\text{mol}$  aldosteron =

$$= \frac{\text{toegevoegd aantal dpm } ^3\text{H-aldosteron}}{\text{specifieke activiteit (dpm}/\mu\text{mol)}} \times \frac{1}{^3\text{H}/^{14}\text{C-ratio (dpm/dpm)}}$$

is nu de specifieke activiteit de enige onbekende en kan dus worden berekend.

In tabel XXI zijn de resultaten weergegeven die werden verkregen bij toepassing van beide methoden op de inhoud van zeven ampullen  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride. De resultaten van beide methoden vertonen een spreiding van -3,3 tot +6,0%. Omdat deze resultaten verkregen werden met twee onafhankelijke meetmethoden, pleit het gevonden geringe verschil voor de nauwkeurigheid van de bepaling der specifieke activiteit van het azijnzuuranhydride.

De resultaten die met de cortisolmethode werden verkregen wijken niet significant af van die welke verkregen werden met de aldosteronmethode, zoals blijkt bij toepassing van de t-test van Student (de JONGE 1960) ( $p = 0,20$ ).

## § 11. DE NAUWKEURIGHEID VAN DE METING DER $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -RATIO BIJ VERSCHILLENDE ISOTOPENVERHOUDINGEN

De  $\beta$ -stralers  $^3\text{H}$  en  $^{14}\text{C}$  werden kwantitatief gemeten met behulp van vloeistofscintillatietelling. Bij dit proces wordt de energie van een  $\beta$ -deeltje door in het telmilieu opgeloste fluorescerende verbindingen omgezet in fotonen. Deze lichtquanta worden door een fotomultiplicator gedetecteerd en de resulterende stroom wordt omgezet in een spanningspuls. Het aantal fotonen dat bij een  $\beta$ -emissie ontstaat is evenredig met de energie van het  $\beta$ -deeltje. De pulshoogte is op zijn beurt evenredig met het aantal fotonen en dus eveneens met de energie van het  $\beta$ -deeltje. De evenredigheidsfactor tussen de hoogte van de puls en de energie van het  $\beta$ -deeltje, dat deze puls veroorzaakt, is een functie van de versterking van het systeem. Een  $\beta$ -straler bezit een continu energiespectrum en dientengevolge is ook het pulsspectrum (pulshoogte uitgezet tegen intensiteit) continu. Met behulp van discriminatoren wordt een bepaald gebied van het spectrum begrensd, welk gebied "venster" wordt genoemd.

In het type vloeistofscintillatieteller dat door ons werd gebruikt (Nuclear) wordt een puls van de fotomultiplicator na voorversterking naar twee afzonderlijke versterkers gevoerd. De "gain" van één van deze versterkers kan worden verzwakt ("attenuated") waardoor de pulshoogten in dit circuit worden verlaagd. Op deze wijze kunnen van

één  $\beta$ -straler twee pulsspectra worden verkregen die, wat pulshoogte betreft, verschillen en die in twee afzonderlijke kanalen geregistreerd kunnen worden. Wanneer men nu in ieder spectrum een venster plaatst, kan één isotoop gelijktijdig met twee verschillende "efficiencies" in de twee kanalen worden geteld. Deze "efficiencies" worden gerepresenteerd door het gedeelte van het pulsspectrum dat door het venster wordt begrensd (figuur 17).

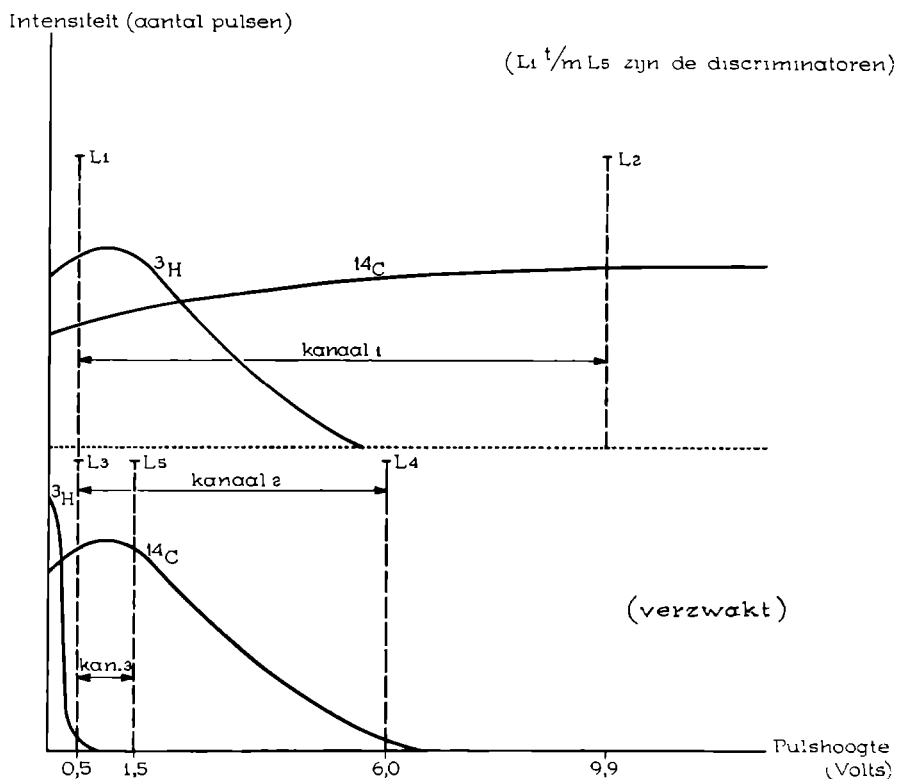


Fig.17. Pulsspectra van  $^3H$  en  $^{14}C$  in de drie kanalen van de vloeistofscintillatie-spectrometer

In een dergelijke opstelling kunnen twee isotopen (A en B), die een voldoende verschillend energiespectrum bezitten, gelijktijdig in één mengsel worden gemeten, ondanks het feit dat de pulsspectra elkaar gedeeltelijk overlappen. Uit het gemeten aantal counts in beide kanalen kan de aanwezige hoeveelheid radioactiviteit van elk der isotopen (in dpm) worden berekend met de volgende twee vergelijkingen:

$$N_1 = a_1x + b_1y$$

$$N_2 = a_2x + b_2y$$

Uit deze twee vergelijkingen volgt:

$$x = \frac{N_1b_2 - N_2b_1}{a_1b_2 - a_2b_1} \quad (I)$$

$$y = \frac{N_2a_1 - N_1a_2}{a_1b_2 - a_2b_1} \quad (II)$$

waarin:

$N_1$  = aantal counts in kanaal 1 (minus de background)

$N_2$  = aantal counts in kanaal 2 (minus de background)

$a_1$  = efficiency van de meting van isotoop A in kanaal 1

$a_2$  = efficiency van de meting van isotoop A in kanaal 2

$b_1$  = efficiency van de meting van isotoop B in kanaal 1

$b_2$  = efficiency van de meting van isotoop B in kanaal 2

$x$  = aantal dpm van isotoop A

$y$  = aantal dpm van isotoop B

$a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  en  $b_2$  worden bepaald met behulp van ijkstandaarden van de isotopen A en B.

Na meting van  $N_1$  en  $N_2$  kunnen  $x$  en  $y$  met behulp van de vergelijkingen (I) en (II) worden berekend.

De gebruikte vloeistofscintillatie-spectrometer biedt de mogelijkheid om met behulp van een derde venster (figuur 17 kanaal 3) op eenvoudige wijze na te gaan of storende stoffen aanwezig zijn die de efficiency van de telling verlagen. Door dit fenomeen (de zogenaamde "quenching")

T a b e l XXII

De "efficiency" van de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteitsmeting  
in de drie kanalen van de vloeistofscintillatie-teller

Kanaal	$^3\text{H}$ -efficiency in %	$^{14}\text{C}$ -efficiency in %	"Background" in cpm
1	31,3	17,1	50
2	0,2	58,3	20
3	0,2	39,8	20

verschuiven de pulsspectra naar een lager voltage-gebied waardoor de verhouding van het aantal counts, dat in twee kanalen (2 en 3, figuur 17) wordt gemeten, verandert.

Voor een exacte bepaling van de "efficiencies" is het van belang de ijkstandaarden zodanig samen te stellen, dat de telcondities daarvan identiek zijn aan die van de te meten monsters. In het algemeen is het noodzakelijk bij elke meetreeks de "efficiencies" vast te stellen. Een voorbeeld van de "efficiencies" van de meetinstelling (zie figuur 17) is vermeld in tabel XXII. Met behulp van deze "efficiencies" en de vergelijkingen (I) en (II) kunnen de volgende formules worden opgesteld:

$${}^3\text{H-radioactiviteit (dpm)} = \frac{0,583 N_1 - 0,171 N_2}{0,182}$$

$${}^{14}\text{C-radioactiviteit (dpm)} = \frac{0,313 N_2 - 0,002 N_1}{0,182}$$

De reproduceerbaarheid en de nauwkeurigheid van de radioactiviteitsmeting zijn afhankelijk van de isotopenverhouding van het monster (OKI-TA c.s. 1957, BUSH 1964, PETERSON en EILERS 1965). Om deze reden werden de reproduceerbaarheid en de nauwkeurigheid van onze radioactiviteitsmeting onderzocht over een  ${}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}$ -ratio bereik van 0,11 tot 217. Daartoe werden standaarden van  ${}^3\text{H}$ - en  ${}^{14}\text{C}$ -tolueen met scintillatievloeistof verdund en deze "stamoplossingen" werden in verschillende verhoudingen gecombineerd. De zo verkregen reeks van monsters met verschillende  ${}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}$ -ratio's werd 18 keer geteld, telkens met een tussentijd van een dag. De stamoplossingen werden in elke telronde eveneens gemeten en uit deze metingen werden de "efficiencies" berekend, benodigd voor de bovenbeschreven formules. Elk monster uit de reeks werd telkens gedurende 40 minuten geteld.

Het verschil tussen de gemeten en de berekende  ${}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}$ -ratio (dpm/dpm) werd uitgedrukt als percentage van de berekende ratio. Van elk van de verschillende  ${}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}$ -ratio's werd dus 18 keer de afwijking tot de berekende ratio vastgesteld. Van deze reeks van 18 procentuele verschillen werd de standaarddeviatie berekend. Deze standaarddeviaties, die een maat zijn voor de reproduceerbaarheid van de meting, zijn in figuur 18 afgezet op de ordinaat. Op de abscis zijn de berekende  ${}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}$ -ratio's afgezet met daaronder de berekende hoeveelheid  ${}^3\text{H}$ - en  ${}^{14}\text{C}$ -radioactiviteit (in dpm) die in het betreffende monster aanwezig was.

Uit de figuur blijkt dat de standaarddeviatie in het radiogebied tussen 0,54 en 54,31 redelijk constant is; gemiddeld bedraagt zij in dit gebied 1,9%. Op grond van deze gemiddelde waarde kan in het bovengenoemde radiogebied in 95% van de metingen een niet-systematische fout worden verwacht van  $2 \times 1,9 = 3,8\%$ . Bij lagere en hogere  ${}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}$ -



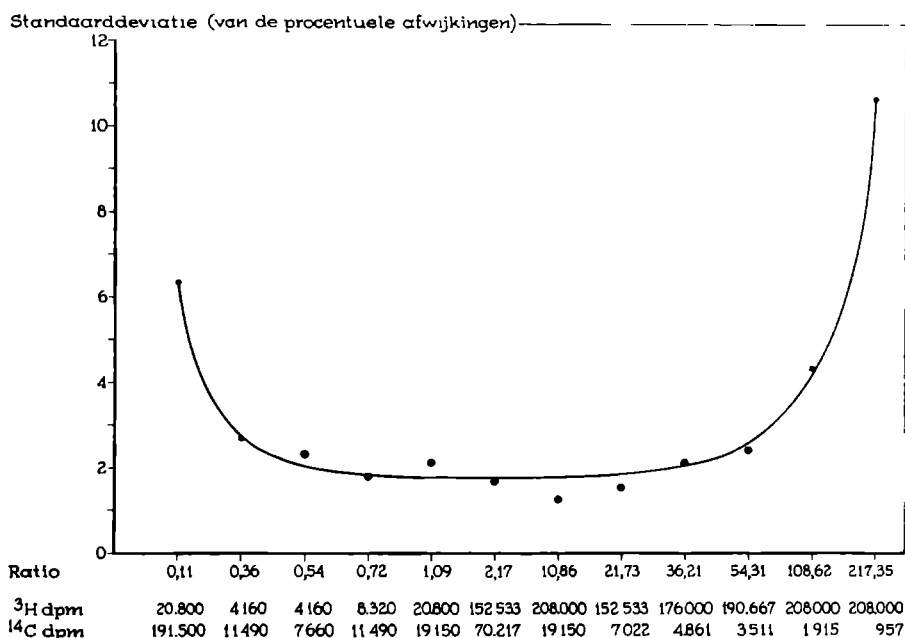


Fig.18. Reproduceerbaarheid van de meting van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio  
Elk monster van de op de abscis aangegeven isotopenverhouding werd 18 keer gemeten in een vloeistofscintillatieteller. De procentuele afwijking tot de berekenderatio werd na elke meting vastgesteld. Elk punt in deze figuur geeft de standaarddeviatie weer van de 18 procentuele verschillen, behorend bij één ratio. Onder de abscis is tevens vermeld de berekende hoeveelheid  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit (in dpm) in elk monster.

ratio's neemt de standaarddeviatie sterk toe en daarmee de te verwachten fout.

Het algebraïsche gemiddelde van de 18 procentuele afwijkingen van iedere ratio is een maat voor de systematische fout. Het algebraïsche gemiddelde van deze systematische fouten bedraagt in het ratiogebied tussen 0,54 en 54,31 1,8% (S.D. 1,5%). Deze systematische fout zal voor een groot deel zijn veroorzaakt door de vluchtigheid van de gebruikte  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -tolueenstandaarden.

## § 12. TERUGWINNING VAN ALDOSTERON NA TOEVOEGING AAN URINE

Om na te gaan of componenten van de urine een storende invloed uitoefenen op de aldosteronbepaling, kan de bepaling worden uitgevoerd, zowel voor als na toevoeging van bekende hoeveelheden aldosteron aan

de urine. Bovendien kan door deze "recovery"proeven worden vastgesteld of bij de terugwinning van de toegevoegde hoeveelheden een systematische fout optreedt. Om deze redenen zijn "recovery"experimenten te beschouwen als een toets voor de nauwkeurigheid van de methode, waarmee dan wordt bedoeld, de mate waarin de werkelijke waarde door de meting wordt benaderd.

In een aantal experimenten werden hoeveelheden aldosteron, variërend van 0,50 tot 15,00  $\mu\text{g}$ , aan onderscheiden urinemonsters toegevoegd. De hoeveelheid aldosteron, die vóór de toevoeging in het urinemonster aanwezig was, werd in een afzonderlijke portie in enkelvoud bepaald. De gegevens en resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in tabel XXIII. De uiterste waarden van de terugwinning bedragen 80 en 112% met een gemiddelde van 101% (S.D. 10,1%). Berekening met behulp van

T a b e l   XXIII

Terugwinning van aldosteron na toevoeging van het hormon  
aan urinemonsters van verschillende personen

Urine- monster	$\mu\text{g}$ aldo- steron vóór toevoeging aanwezig	$\mu\text{g}$ aldo- steron toegevoegd	$\mu\text{g}$ aldo- steron bepaald	$\Delta$ -ratio in %	Terugwin- ning van de toegevoeg- de hoe- veelheid
a	<0,1	0,50	0,48	+ 2,5	96
b	1,07	0,72	1,65	+ 1,8	80
a	<0,1	0,75	0,70	+ 8,5	93
a	<0,1	0,90	0,99	- 4,3	110
a	<0,1	1,50	1,56	- 3,0	104
a	<0,1	3,18	3,34	+ 1,1	105
c	3,04	3,62	7,04	+ 1,8	110
d	1,86	7,24	10,00	0	112
e	2,08	10,86	13,58	- 3,5	105
f	2,92	15,00	16,80	- 7,0	93
					gem. 101*
					S.D. 10,1

\* De gemiddelde waarde wijkt niet significant af van 100 ( $p = 0,74$ ).

T a b e l XXIV

Bepaling van bekende hoeveelheden zuiver aldosteron

$\mu\text{g}$ aldosteron aanwezig	$\Delta$ -ratio in %	$\mu\text{g}$ aldosteron gevonden	Gevonden hoeveelheid: aanwezige hoeveelheid x 100
95,8	- 3,2	95,7	100
31,9	+ 1,9	30,1	94
15,3	+ 0,5	15,1	99
10,9	- 2,6	10,4	96
7,66	+ 1,3	7,61	99
3,62	+ 0,6	3,24	90
1,81	- 2,7	1,84	102
0,91	+ 11,3	0,89	98
0,72	- 5,8	0,70	97
0,36	- 2,3	0,34	94
0,18	+ 2,5	0,17	94
0,09	+ 3,4	0,10	111
	gem. + 0,5		gem. 98*
	S.D. 4,4		S.D. 5,3

\* De gemiddelde waarde wijkt niet significant af van 100 ( $p = 0,22$ ).

de  $t$ -test van Student leert dat de terugwinning niet significant verschilt van 100% ( $p = 0,74$ ).

Uit de gemiddelde  $\Delta$ -ratio van 3,2% (S.D. 2,3%) blijkt dat in deze experimenten het uiteindelijk geïsoleerde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat verregaand was gezuiverd.

Bij twaalf bepalingen van bekende hoeveelheden zuiver aldosteron, waarbij na toevoeging van de verliesindicator direct werd geacetyleerd en daarna gezuiverd volgens onze methode, werd over een traject van circa 0,1 tot 100  $\mu\text{g}$  gemiddeld 98% teruggevonden met als uiterste waarden 90 en 111% (S.D. 5,3%, zie tabel XXIV). Berekening leert dat ook hier de terugwinning niet significant verschilt van 100% ( $p = 0,22$ ).

Het geringe verschil tussen de terugwinning van aldosteron, na toevoeging aan urine, en het meetresultaat van de directe bepaling van bekende hoeveelheden zuiver aldosteron tonen aan, dat de nauwkeurigheid van de bepaling in urine slechts in geringe mate wordt beïnvloed door daarin aanwezige andere componenten.

### § 13. SAMENVATTING

In dit hoofdstuk werden onderzoeken beschreven naar de betrouwbaarheid van de door ons ontwikkelde aldosteronbepaling.

De SPECIFICITEIT, welke geheel berust op de effectiviteit van de chromatografische zuivering, is op de volgende wijzen onderzocht:

#### 1. registratie van de radioactiviteitsverdeling over de chromatogrammen

Uit "scans" van dunnelaagchromatogrammen vóór het papierchromatogram bleek dat het acetyleringsprodukt, ondanks de uitgebreide zuivering die werd toegepast voor acetylering, nog sterk was verontreinigd met aspecifieke  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit. "Scans" van de papierchromatogrammen na acetylering vertoonden daarentegen een symmetrische radioactiviteitspiek op de plaats van aldosterondiacetaat met aan weerszijden weinig of geen aspecifieke radioactiviteit.

#### 2. vergelijking van de $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's na verschillende zuiveringsstappen

Bij 193 bepalingen werd een gemiddelde afwijking van de laatste  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio ten opzichte van de ratio na het voorlaatste chromatogram gevonden van 4,3% met een standaarddeviatie van 5%. Dit betekent dat in 95% van de bepalingen de procentuele verandering in de berekende aldosteronwaarden tengevolge van het laatste chromatogram varieert tussen -5 en +15%.

#### 3. hydrolyse van $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat tot $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat

Het quotiënt van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio ná en vóór hydrolyse bedroeg in 47 bepalingen gemiddeld 2,08 (S.D. 0,09). Deze gemiddelde waarde ligt redelijk dicht bij de theoretische, op grond van de door afsplitsing van één der  $^{14}\text{C}$ -acetaatgroepen te verwachten waarde van 2,00. Bij negen bepalingen werd een afwijking van de theoretische waarde waargenomen groter dan 15%. In deze gevallen was de aanwezige  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit te gering om een betrouwbare meting te garanderen, aangezien de blanco-waarde van de bepaling bij deze hoeveelheden radioactiviteit zijn invloed doet gelden.

4. bepaling van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio in opeenvolgende delen van de papierchromatografische vlek van  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat

Zowel bij zuiver als bij van urine afkomstig  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat werd op papierchromatogrammen een systematische daling van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio over de vlek (vanaf de startzijde) waargenomen. Hetzelfde fenomeen deed zich voor bij papierchromatografie van mengsels van  $^3\text{H}$ -aldosteron en  $^{14}\text{C}$ -aldosteron. Na dunne-laagchromatografie werd een minder geprononceerd verloop van de ratio waargenomen.

Het niet homogeen zijn van de vlek werd niet door radioactieve verontreinigingen veroorzaakt maar door het verschijnsel van isotooptfractionering. Dit fenomeen sluit constant zijn van  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio's in delen van de chromatografische vlek als criterium van zuiverheid uit. Dit betekent voorts, dat het noodzakelijk is om de gehele vlek (of een symmetrisch gedeelte) te elueren om een fout ten gevolge van isotooptfractionering in de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio te vermijden.

De GEVOELIGHEID van de bepaling is, bij een gegeven specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride, afhankelijk van de blanco-waarde en van de "overall recovery". Van de blanco-waarde werd een indruk verkregen door de bepaling uit te voeren op urine van bijnierloze patiënten. De blanco-waarde in deze experimenten bedroeg gemiddeld  $0,3 \mu\text{g}/24$ -uurs urine. Bij het uitvoeren van de bepaling op gedestilleerd water werden waarden gevonden van dezelfde grootte-orde. De onderste gevoeligheidsgrens zou, gebaseerd op deze meetwaarde van  $0,3 \mu\text{g}$ , gesteld kunnen worden op  $0,6 \mu\text{g}$  aldosteron/ $24$ -uurs urine. De "overall recovery" van de bepaling bedraagt 29% en laat - bij de gekozen specifieke activiteit van het azijnzuuranhydride van  $2 \text{ mC}/\text{mmol}$  - een meting toe van  $0,4 \mu\text{g}/24$ -uurs urine. Deze "overall recovery" zal, gezien de gunstige opbrengsten van de onderscheiden stappen, nauwelijks verhoogd kunnen worden. Uit een onderzoek naar de ontleding van vrij aldosteron tijdens dunne-laagchromatografie bleek dat deze van weinig betekenis is, wanneer het steroïd onmiddellijk na de chromatografie wordt geëluëerd.

De REPRODUCEERBAARHEID van de bepaling werd nagegaan door een aantal urinemonsters in meervoud te bepalen evenals een tweetal oplossingen van zuiver aldosteron. De waargenomen spreiding binnen de groepen varieerde van 3,3 tot 6,9% (standaardafwijking in %) en lag voor de bepaling van de urines in dezelfde grootte-orde als de standaarddeviaties voor de bepalingen van zuiver aldosteron.

De NAUWKEURIGHEID van de methode hangt, wanneer aan de eis van

radiochemische zuiverheid van het geïsoleerde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat is voldaan, voornamelijk af van de nauwkeurigheid van de bepaling der specifieke activiteit van het  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride en van de nauwkeurigheid der radioactiviteitsmeting. Een indruk omtrent de nauwkeurigheid van de bepaling der specifieke activiteit werd verkregen door deze te meten met twee onafhankelijke methoden: met behulp van cortisol en aldosteron. Er was geen significant verschil tussen de met beide methoden verkregen resultaten.

Naar de nauwkeurigheid van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratiometing werd een onderzoek ingesteld door met behulp van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -tolueen een reeks van ratio's samen te stellen en elke ratio verschillende keren te meten. De nauwkeurigheid van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratiometing bleek afhankelijk van de grootte van de ratio's. In het gebied tussen 0,5 en 50 was de standaarddeviatie van de meting 1,9%.

De nauwkeurigheid van de aldosteronbepaling werd tenslotte onderzocht door vast te stellen welk percentage van een aan urine toegevoegde hoeveelheid aldosteron kon worden teruggewonnen. Daarbij werden verschillende hoeveelheden aldosteron toegevoegd aan onderscheiden urinemonsters. De gemiddelde terugwinning bedroeg 101% met een standaarddeviatie van 10,1%. Bepalingen van verschillende bekende hoeveelheden zuiver aldosteron leverden een gemiddelde van 98% van de werkelijk aanwezige hoeveelheid met een standaarddeviatie van 5,3%.

## HOOFDSTUK VI

### TOEPASSINGEN VAN DE METHODE

#### § 1. INLEIDING

In dit hoofdstuk worden resultaten vermeld die met behulp van de methode zijn verkregen. Zij geven een indruk van de excretie- en secretiewaarden, die bij toepassing van de bepaling kunnen worden verwacht. De resultaten worden vergeleken met gegevens uit de literatuur.

De excretiemetingen (§ 2) werden verricht bij normale \*) volwassenaan, zowel tijdens gebruik van een natriumhoudend als bij gebruik van een natriumarm dieet. Bovendien worden excretiewaarden vermeld van twee patiënten lijdende aan primair aldosteronisme (het syndroom van CONN), vóór en ná verwijdering van de bijnier die het aldosteron producerende adenoom bevatte.

Eveneens werden secretiemetingen (§ 3) verricht bij normale volwassenen tijdens gebruik van een natriumhoudend en natriumarm dieet, al dan niet in combinatie met adrenocorticotroop hormoon (ACTH), of angiotensine II. In deze paragraaf wordt tevens een beknopte beschrijving van het principe van de meting van de secretiesnelheid gegeven.

De methode werd ook gebruikt voor metingen van de aldosteronproductie in vitro van bijnierweefsel van ratten (§ 4).

#### § 2. EXCRETIEWAARDEN VAN ALDOSTERON

In hoofdstuk II werd aangegeven dat met aldosteronexcretie wordt bedoeld de hoeveelheid 3-oxo-conjugaat die per 24 uur met de urine wordt uitgescheiden. De hoeveelheid 3-oxo-conjugaat, die wordt uitgescheiden, is slechts een grove maat voor de hoeveelheid aldosteron die door de bijnierschors geproduceerd wordt. Het percentage van aldosteron, dat als 3-oxo-conjugaat wordt uitgescheiden, varieert namelijk

---

\*) De onderzochte personen waren patiënten die in de Nijmeegse Universiteitskliniek voor inwendige ziekten (hoofd: Prof. Dr. C. L. H. Majoor) waren opgenomen. Zij worden als "normaal" aangeduid, omdat zij niet leden aan een ziekte, waarbij de produktie en stofwisseling van aldosteron verandering ondergaan. In de periode van de waarnemingen hielden zij nagenoeg volledige, en op de dagen van de metingen volledige bedrust. Zij gebruikten een dieet, dat voor natrium en kalium gestandaardiseerd was.

T a b e l XXV

Excretie van het 3-oxo-conjugaat van aldosteron  
bij tien normale volwassenen

Persoon	Excretie in $\mu\text{g}/24$ uur	
	Natriumhoudend dieet*	Natriumarm dieet**
1	9,7	30,5
2	5,8	22,9
3	7,0	21,3
4	4,4	
5	7,6	
6	7,3	
7	8,5	
8	10,8	
9	5,0	
10	10,7	
	gem. 7,7	gem. 24,9
	S.D. 2,3	S.D. 4,9
p = 0,03***		

\* 80 - 160 meq Natrium/dag  
55 - 135 meq Kalium/dag

\*\* 10 - 20 meq Natrium/dag  
55 - 135 meq Kalium/dag

\*\*\* Dubbelzijdige overschrijdingskans, berekend met de toets van Wilcoxon (zie RUMKE en van EEDEN 1960).

bij verschillende personen van 5 tot 15% (KAPLAN 1963), welke variatie onder pathologische omstandigheden zelfs nog groter kan zijn (zie ook hoofdstuk II). Toch werden in een aantal gevallen excretiemetingen verricht, voornamelijk om de resultaten van onze methode te kunnen vergelijken met die uit de literatuur.

In tabel XXV zijn de excretiewaarden van het 3-oxo-conjugaat vermeld, die werden gemeten bij tien normale volwassenen. De gemiddelde waarde bedroeg bij gebruik van een natriumhoudend dieet  $7,7 \mu\text{g}/24$  uur; bij een natriumarm dieet was de excretie significant hoger en bedroeg  $24,9 \mu\text{g}/24$  uur. Deze waarden stemmen goed overeen met waarden uit de literatuur, eveneens verkregen met een methode waarbij gebruik werd gemaakt van een verliesindicator (zie tabel XXVI).



T a b e l XXVI

Literatuurgegevens betreffende de aldosteronexcretie  
bij normale personen

Auteurs	Aantal personen	Natrium- opneming per dag	Aldosteron- excretie ( $\mu\text{g}/24$ uur)	Gem.
AYRES c.s. (1956)	31	?	4,6 - 23,5	11
KLIMAN & PETERSON (1960)	26	?	5 - 19	10
FLOOD c.s. (1961)	14	172 meq	4,7 - 10,0	7,7
SIEGENTHALER c.s. (1962)	10	130 meq	4 - 16	10,7

T a b e l XXVII

Aldosteronexcretie van twee patiënten met primair aldosteronisme  
voor en na verwijdering van een adenoom bevattende bijnier

Patiënt	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio na chromatogram			$\Delta$ -ratio in %	Aldosteron- excretie in $\mu\text{g}/24$ uur
	III	IV	V		
G.-J. pre-operatief	0,59	0,64	0,65	+ 1,6	44,2
1e dag postoperatief	3,63	-	18,25	-	4,0
2e dag postoperatief	26,21	95,76	114,82	+ 19,0	1,0
3e dag postoperatief	19,36	70,84	77,46	+ 8,6	1,5
4e dag postoperatief	8,61	67,30	73,39	+ 9,1	1,6
5e dag postoperatief	6,88	-	56,41	-	2,0
Br. pre-operatief		3,60	3,85	+ 6,9	29,7
4e dag postoperatief		6,82	6,69	- 1,9	1,6
5e dag postoperatief		3,83	3,95	- 3,4	2,7

Ook bij twee patiënten lijdende aan het syndroom van Conn werden aldosteronexcreties gemeten. Deze bepalingen werden gedaan zowel vóór als na verwijdering van de adenoom bevattende bijnier (zie tabel XXVII). Uit deze tabel blijkt, dat de excretiewaarden na de operatie, zoals verwacht, veel lager zijn dan vóór deze ingreep. Zelfs excretiewaarden van 1 tot  $2\mu\text{g}/24$  uur blijken, gezien de  $\Delta$ -ratio's, nog met redelijke specificiteit gemeten te kunnen worden.

### § 3. SECRETIEWAARDEN VAN ALDOSTERON

Met secretiewaarden van aldosteron wordt bedoeld de hoeveelheid aldosteron die per 24 uur door de bijnieren wordt gesecerneerd.

In de vorige paragraaf werd er op gewezen, dat het gedeelte van het endogene aldosteron, dat wordt omgezet in het 3-oxo-conjugaat, niet constant is. Meting van de excretie van dit conjugaat geeft dientengevolge niet steeds een juiste indruk omtrent de adrenale aldosteronsecretie. Bij de bepaling van de secretiesnelheid van aldosteron door middel van isotoopdilutie in vivo speelt een veranderd metabolisme geen rol. Dit zal blijken uit de hier volgende summier beschrijving van het principe der secretiesnelheidsmeting.

Bij meting van de secretiesnelheid wordt een bekende hoeveelheid (a dpm)  $^3\text{H}$ -aldosteron, waarvan de gewichtshoeveelheid te verwaarlozen is ten opzichte van het endogene aldosteron, intraveneus ingespoten. De tracer zal, wanneer snelle en homogene menging met het endogene aldosteron plaatsvindt, hetzelfde lot ondergaan als het door de bijnieren gesecerneerde aldosteron. Een bepaald gedeelte (b dpm) van het ingespoten  $^3\text{H}$ -aldosteron wordt in de lever omgezet in het  $^3\text{H}$ -3-oxo-conjugaat, dat vervolgens met de urine wordt uitgescheiden. Van het endogene aldosteron ( $x\mu\text{g}$ ) wordt eenzelfde gedeelte ( $\frac{b}{a}$ ) uitgescheiden als 3-oxo-conjugaat (dus  $\frac{b}{a} \cdot x\mu\text{g}$ ). Dit geldt alleen als aan de volgende voorwaarden is voldaan:

1. het percentage van het aldosteron, dat wordt omgezet in het 3-oxo-conjugaat, moet in de periode van de urineverzameling constant zijn
2. aan het eind van de urineverzameling moet het gevormde  $^3\text{H}$ -aldosteron-3-oxo-conjugaat volledig zijn uitgescheiden
3. de totale hoeveelheid endogeen aldosteron moet aan het begin en aan het einde van de proefopstelling even groot zijn ("steady state").

Uit diverse onderzoeken is gebleken dat bij de beschreven proefopstelling aan deze voorwaarden is voldaan (LAUMAS c.s. 1961a, 1961b, GURPIDE c.s. 1962).

Het uitgescheiden 3-oxo-conjugaat heeft een specifieke activiteit, uitgedrukt in dpm  $^3\text{H}/\mu\text{g}$ , die omgekeerd evenredig is met de secretiesnelheid van het aldosteron. Immers:

$$\text{Specifieke activiteit} = \frac{\frac{b \text{ dpm } ^3\text{H}}{\frac{b}{a} \cdot x \mu\text{g}}}{x} = \frac{a}{x} \quad (\text{I})$$

Wanneer men de ingespoten hoeveelheid  $^3\text{H}$ -aldosteron in dpm kent en de specifieke activiteit van het 3-oxo-conjugaat bepaald is, kan  $x$  worden berekend. Voor de bepaling van de specifieke activiteit wordt door hydrolyse aldosteron uit het 3-oxo-conjugaat vrijgemaakt en vervolgens uit de urine in zuivere vorm geïsoleerd. Uit de meting van de  $^3\text{H}$ -radioactiviteit en de daarbij behorende gewichtshoeveelheid aldosteron volgt nu de specifieke activiteit van het aldosteron. De specifieke activiteit van het 3-oxo-conjugaat is hieraan gelijk.

De meting van de gewichtshoeveelheid kan, zoals in onze methode, geschieden door reactie met  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride, waarbij twee  $^{14}\text{C}$ -acetaatgroepen in het aldosteronmolecuul worden ingevoerd. De bepaling van de specifieke activiteit komt in dit geval neer op een gelijktijdige meting van de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit van het geïsoleerde aldosterondiacetaat. Wanneer tengevolge van de invoering van  $^{14}\text{C}$ -radioactiviteit 1  $\mu\text{g}$  aldosteron overeenkomt met  $s$  dpm  $^{14}\text{C}$  en bij de uiteindelijke meting  $m$  dpm  $^3\text{H}$  en  $n$  dpm  $^{14}\text{C}$  aanwezig zijn, dan volgt:

$$\text{Specifieke activiteit} = \frac{m}{\frac{n}{s}} \quad (\text{II})$$

Uit (I) en (II) volgt:

$$\frac{m}{\frac{n}{s}} = \frac{a}{x}$$

$$\text{en dus:} \quad x = \frac{a}{s} \cdot \frac{n}{m}$$

waarin:

$x$  = secretie van aldosteron in  $\mu\text{g}/24$  uur

$a$  = hoeveelheid ingespoten  $^3\text{H}$ -aldosteron in dpm

$s$  = aantal dpm  $^{14}\text{C}$  overeenkomend met 1  $\mu\text{g}$  aldosteron

$n$  = hoeveelheid  $^{14}\text{C}$  aanwezig bij de uiteindelijke meting in dpm

$m$  = hoeveelheid  $^3\text{H}$  aanwezig bij de uiteindelijke meting in dpm

Hieruit blijkt, dat de grootte van de fractie van aldosteron die omgezet wordt in het 3-oxo-conjugaat geen invloed heeft op het meetresultaat. Voor een diepgaande discussie over de theoretische achtergronden van metingen van de secretiesnelheid van steroidhormonen wordt verwezen naar de studie van TAIT en BURSTEIN (1964).

Met de beschreven methode werden onder diverse experimentele en pathologische omstandigheden metingen verricht van de secretiesnelheid van aldosteron. Deze metingen hadden tot doel de regeling van de

T a b e l XXVIII

Secretiesnelheid van aldosteron (in  $\mu\text{g}/24$  uur) bij gezonde volwassenen tijdens gebruik van een natriumhoudend en een natriumarm dieet

Persoon	Natriumhoudend dieet *	Natriumarm dieet *
1	146	233 312
2	77	345
3	106	295 244
4	120 101	402
5	94	
6		487
7		408 435
8		400
9	117	307
10	150	
11		290
12		275
13		361 360
14		481 468
15		485
	gem. 114	gem. 366
	S.D. 25	S.D. 84
p = 0,0003**		

\* Voor natrium- en kaliumconcentraties: zie onderschrift figuur 19.

\*\* Dubbelzijdige overschrijdingskans, berekend met de toets van Wilcoxon.

secretie van aldosteron bij de mens te bestuderen en afwijkingen hierin vast te stellen. De resultaten hiervan worden besproken in de dissertatie van KLOPPENBORG (1966). Zoals blijkt uit de resultaten van laatstgenoemde studie is een zinvolle interpretatie van secretiewaarden van aldosteron slechts mogelijk, indien daarbij een aantal klinische gegevens wordt betrokken. Zo zijn bijvoorbeeld gegevens over de water- en mineralenhuishouding, de bloeddruk en het lichaamsgewicht van belang, terwijl controle op de verzameling van de urine (kreatinine-uitscheiding) geboden is.

De secretiewaarden van aldosteron die in deze paragraaf worden vermeld geven het bereik aan van de "normale waarden" die onder gestandaardiseerde opname van natrium en kalium werden gemeten. Bovendien wordt het effect geïllustreerd van twee bekende stimulators van de aldosteronsecretie: angiotensine II en ACTH.

In tabel XXVIII zijn waarden van de secretiesnelheid van aldosteron weergegeven, gemeten bij normale volwassenen die een natriumhoudend en (of) een natriumarm dieet gebruikten. Tijdens gebruik van een natriumhoudend dieet was de gemiddelde aldosteronsecretie  $114 \mu\text{g}/24$  uur (S.D. 25); tijdens natriumarm dieet is de aldosteronproductie significant hoger en bedraagt gemiddeld  $366 \mu\text{g}/24$  uur (S.D. 84). Bij een persoon die in de tabel is aangeduid met 4 werd tijdens natriumhoudend dieet op twee dagen de aldosteronsecretie gemeten; bij vijf personen (1, 3, 7, 13 en 14) werd een herhaalde meting verricht in de periode van een natriumarm dieet. Het is opvallend dat de variatie in de aldosteronsecretie bij ieder van deze personen gering is; het grootste verschil werd waargenomen bij persoon 1, waar op de twee dagen secretiesnelheden werden gemeten van 233 en  $312 \mu\text{g}/24$  uur.

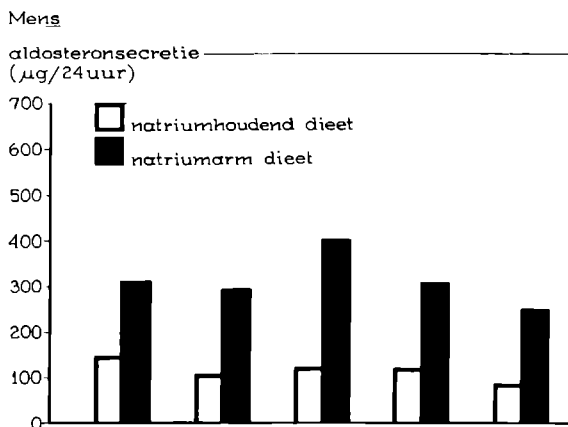


Fig.19. Secretiesnelheid van aldosteron bij normale volwassenen tijdens gebruik van een natriumhoudend en een natriumarm dieet

Natriumhoudend dieet: 80-160 meq/dag

Natriumarm dieet: 10- 20 meq/dag

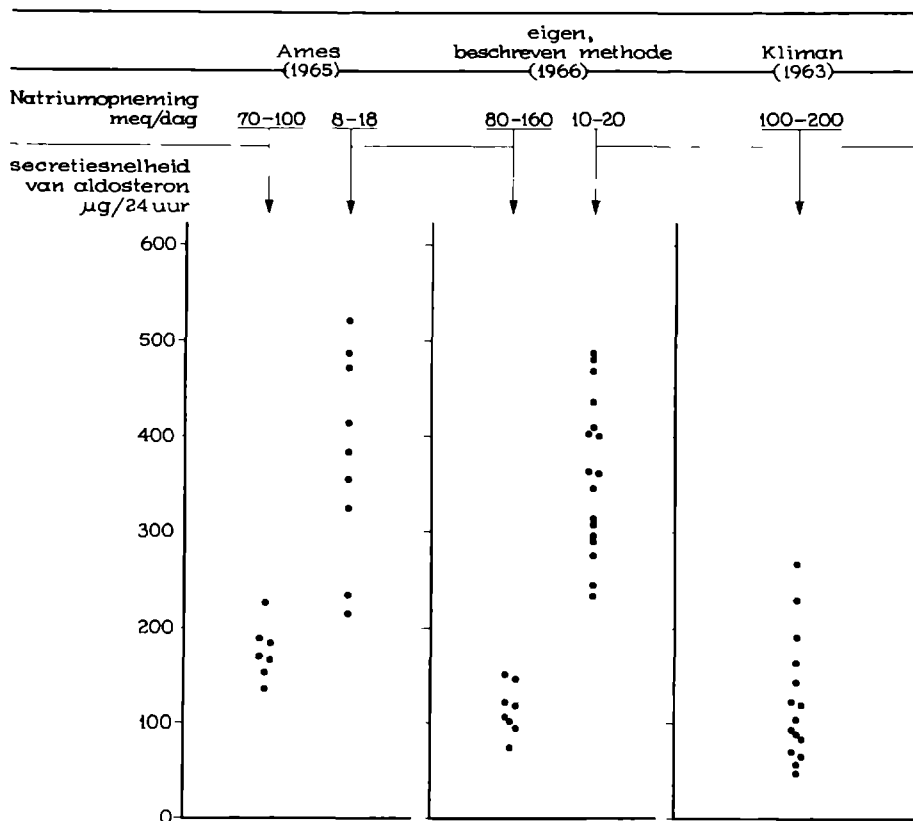


Fig.20. Vergelijking van de door ons bepaalde secretiesnelheden van aldosteron tijdens gebruik van een natriumhoudend en een natriumarm dieet met de door AMES c.s. (1965) en KLIMAN (1963) gepubliceerde waarden

Ook uit figuur 19, waarin de waarnemingen bij de personen 1, 2, 3, 4 en 9 uit tabel XXVIII zijn opgenomen, blijkt duidelijk, dat de aldosteronsecretie tijdens het gebruik van een natriumarm dieet hoger is dan tijdens natriumhoudend dieet. De toeneming varieert van 114 tot 235% van de uitgangswaarde (natriumhoudend dieet). Ter vergelijking zijn in figuur 20 de door ons bepaalde "normale waarden" weergegeven naast die welke door AMES c.s. (1965) en KLIMAN (1963) werden gepubliceerd. Deze onderzoekers gebruikten bij de meting van de aldosteronsecretie eveneens een dubbel-isotoop methode. Zoals uit de figuur blijkt stemmen de waarden goed overeen.

Het stimulerende effect van angiotensine II (hypertensin Ciba, val<sup>5</sup>-hypertensine-II-as<sup>1</sup>-β-amide) werd eveneens bij een aantal normale volwassenen onderzocht. Twee waarnemingen werden verricht bij twee

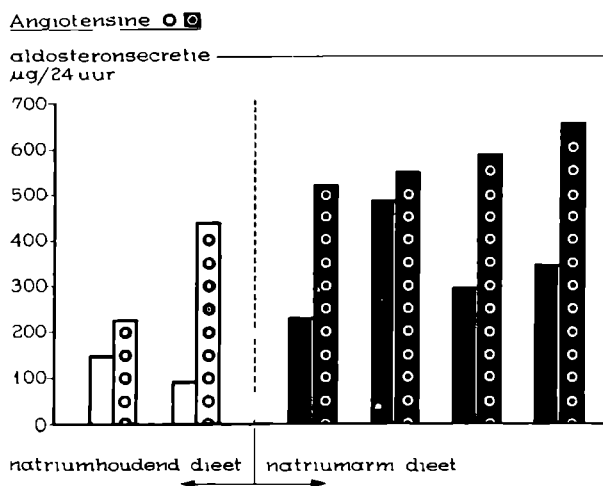


Fig.21. Effect van angiotensine II op de secretiesnelheid van aldosteron bij normale volwassenen tijdens gebruik van een natriumhoudend en een natriumarm dieet

Dieet: Natriumhoudend 115-160 meq/dag

Natriumarm 10- 15 meq/dag

Dosering: 5-10 nanogram/kg lichaamsgewicht/minuut intraveneus in een infuus van 1 liter 5% glucose-oplossing, dat in 24 uur werd gegeven.

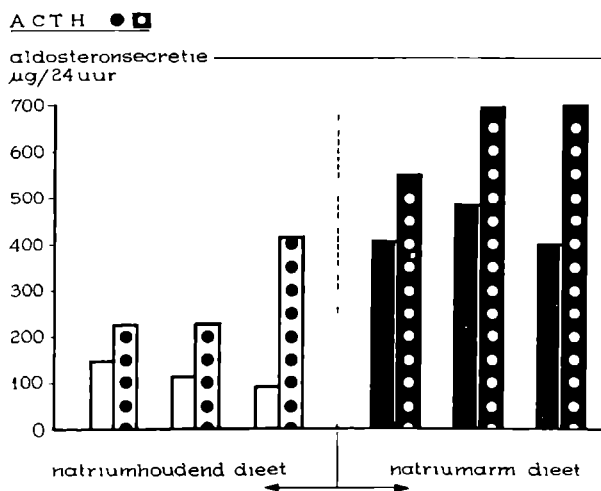


Fig.22. Effect van ACTH op de secretiesnelheid van aldosteron bij normale volwassenen tijdens gebruik van een natriumhoudend en een natriumarm dieet

Dieet Natriumhoudend 115-160 meq/dag

Natriumarm 10- 20 meq/dag

Dosering: 120 E ACTH intraveneus in een infuus van 1 liter 5% glucose-oplossing, dat in 24 uur werd gegeven

personen, die een natriumhoudend en bij vier personen, die een natrium-arm dieet gebruikten. In figuur 21 zijn de resultaten weergegeven. Zowel tijdens natriumhoudend als tijdens natriumarm dieet blijkt een duidelijke verhoging ten opzichte van de controlewaarde op te treden, weliswaar met een grote spreiding in de procentuele toeneming (12-370%), doch statistisch significant ( $p = 0,03$  volgens tekentoets \*)). De geconstateerde verhoging tijdens toediening van angiotensine II stemt goed overeen met die welke door de groep van LARAGH werd gevonden (AMES c.s. 1965). In doseringen van 0,21 tot 2,2  $\mu\text{g}/\text{minuut}$ , maten zij een toeneming van de secretiesnelheid van 87 tot 511% van de uitgangswaarde.

Het stimulerende effect van ACTH werd bestudeerd bij zes normale volwassenen, van welke drie een natriumhoudend en drie een natrium-arm dieet gebruikten. In figuur 22 zijn de resultaten weergegeven die hierbij werden verkregen. Ook hier werd een duidelijk stimulerend effect op de aldosteronsecretie vastgesteld. De toeneming ten opzichte van de controlewaarde varieert tussen 35 en 346%, hetgeen statistisch significant is ( $p = 0,03$  volgens de tekentoets). Het stimulerende effect van ACTH op de aldosteronsecretie werd door KLIMAN (1961) vermeld. Op de vierde dag van toediening van 2 maal 100 E intramusculair per dag werden aldosteronsecreties gemeten die 60 tot 300% hoger waren dan de uitgangswaarde. Ook ULICK c.s. (1964) zagen een stimulerend effect van ACTH op de secretiesnelheid van aldosteron. Bij een dosering van 25 E over 8 uur werd bij twee normale personen een stijging gevonden van 60-90% van de uitgangswaarde.

#### § 4. ALDOSTERONPRODUKTIE IN VITRO DOOR BIJNIERWEEFSEL VAN DE RAT

GIROUD c.s. (1956) hebben als eersten aangetoond, dat geïsoleerd bijnierweefsel van ratten in vitro aldosteron kan produceren. Sindsdien hebben een groot aantal onderzoekers met behulp van in vitro-proeven de regeling van de aldosteronproduktie bestudeerd. Onze landgenote van der WAL (1964) besprak in haar proefschrift de literatuur hieromtrent op kritische wijze. LAPLANTE en STACHENKO (1966) hebben er in een recente publikatie nog eens de aandacht op gevestigd, dat omstandigheden in vivo (verschillen in aanbod van natriumchloride) invloed hebben op de aldosteronproduktie in vitro.

De in hoofdstuk IV beschreven aldosteronbepaling wordt in ons laboratorium toegepast als onderdeel van een studie naar de secretie van corticosteroiden door bijnierweefsel in vitro. Ter illustratie van de toepassingsmogelijkheden van de door ons uitgewerkte aldosteron-

---

\*) Zie: RÜMKE en van EEDEN (1960)



bepalingsmethode worden in deze paragraaf de resultaten van enkele experimenten besproken waarin de invloed werd nagegaan van de natriumopneming met het dieet op de aldosteronproductie in vitro door bijnierweefsel van de rat. Bovendien worden de resultaten getoond van een experiment waarin de aldosteronproductie in vitro werd gemeten bij verschillende kaliumconcentraties in het incubatiemedium. De resultaten zullen aan de hand van gegevens uit de literatuur worden besproken.

**METHODIEK:** Als proefdieren werden mannelijke Wistar-ratten gebruikt met een gewicht variërend van 150 tot 200 gram. De dieren werden gevoerd met het synthetische dieet volgens HARTROFT en EISENSTEIN (1957) waaraan 20 mg thiamine (vitamine B1) per kilogram dieet was toegevoegd. De natriumconcentratie van dit dieet was 0,01%. De natriumdeficiënt gevoerde ratten kregen dit dieet zonder toevoeging van extra natriumchloride; de controledieren werd hetzelfde voer verstrekt, dat echter door toevoeging van natriumchloride een natriumconcentratie had van 0,20%. Vast voedsel en gedestilleerd water werden ad libitum verstrekt. Na decapitatie werden de bijniereën geëxstirpeerd en na verwijdering van omringend vetweefsel in vier zoveel mogelijk gelijke delen verdeeld. Na weging werd het bijnierweefsel in 2 ml KREBS-RINGER-bicarbonaat buffer (0,2% glucose bevattend) gebracht. Vervolgens werd gedurende  $\frac{1}{2}$  uur geïncubeerd in een Dubnoff metabolic shaker bij 37°C in een atmosfeer van 95% zuurstof en 5% kooldioxyde. Na deze pre-incubatieperiode werd de incubatievloei stof verwijderd en aan het bijnierweefsel in het incubatievatje 2 ml verse buffer toegevoegd. Aan het medium werd 0,025 ml van een alcoholische oplossing van  $^3\text{H}$ -aldosteron toegevoegd, waarna gedurende 2 uur onder de eerder genoemde omstandigheden werd geïncubeerd. Vervolgens werd het medium drie keer geëxtraheerd met 6 ml dichloormethaan. Na afdampen van het oplosmiddel werd gechromatografeerd en verliep de bepaling verder zoals beschreven in hoofdstuk IV. Bij de experimenten werden in ieder incubatievatje de kwarten van acht bijniereën bijeengevoegd (+ 200 mg).

De invloed van de natriumopneming met het dieet op de aldosteronproductie in vitro blijkt uit de resultaten die zijn weergegeven in figuur 23. Na gebruik van het controledieet (natriumhoudend) gedurende 14 dagen, werd in vitro een gemiddelde aldosteronproductie gemeten van  $1,56 \mu\text{g}/100\text{mg}/2$  uur (S.D. 0,16; 17 experimenten). De aldosteronproductie in vitro van bijnierweefsel van ratten die gedurende dezelfde periode het natriumdeficiënte dieet gebruikten was gemiddeld  $5,62 \mu\text{g}/100\text{mg}/2$  uur (S.D. 0,73; 5 experimenten). Hieruit blijkt dat de aldosteronproductie in vitro zeer significant wordt verhoogd door een verminderde natriumopneming in vivo ( $p < 10^{-4}$  volgens de toets van Wilcoxon). De histologische veranderingen die optreden in de bijnier van de rat tengevolge van een natriumdeficiënt dieet zijn sinds de eerste waarnemingen van DEANE c.s. (1948) door verschillende onderzoekers gerapporteerd (HARTROFT en HARTROFT 1955, GOLDMAN c.s. 1956, HARTROFT en EISENSTEIN 1957, MOSIER en RICHTER 1958, COHEN en CRAWFORD 1962, MARX en DEANE 1963). Deze veranderingen bestaan in hoofdzaak uit een verbreding van de zona glomerulosa en een

vermindering van het vetgehalte in deze zône. Op ons laboratorium werden deze veranderingen eveneens vastgesteld (niet gepubliceerde waarnemingen, WELLEN 1965). Na één week natriumdeficiënt dieet was de zona glomerulosa nog nauwelijks verbreed. Na twee weken was de breedte van deze zône ongeveer verdubbeld en na vijf weken minstens verdrievoudigd (zie figuur 24).

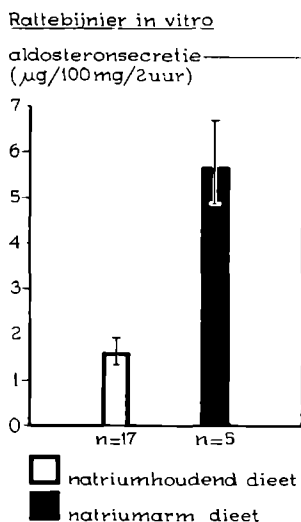


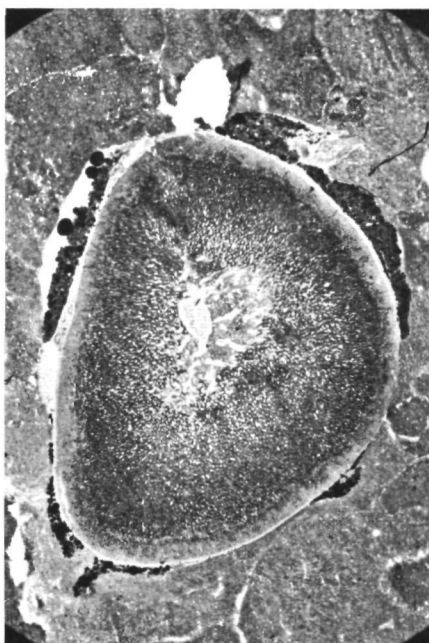
Fig.23. Invloed van een natriumhoudend en een natriumarm dieet op de aldosteronproductie in vitro door bijnierweefsel van de rat. Het natriumhoudende dieet bevatte 0,20% Natrium, het natriumarme dieet 0,01% Natrium. De meting vond plaats, nadat de dieren 14 dagen met deze diëten gevoerd waren.

GIROUD c.s. (1956) hebben als eersten aangetoond dat juist de zona glomerulosa het gedeelte van de bijnier van de rat is, dat aldosteron produceert. EISENSTEIN en HARTROFT (1957) stelden geheel in overeenstemming hiermee vast, dat de produktie van aldosteron in vitro toeneemt als gevolg van natriumdeficiëntie in vivo. Er blijkt dus een positieve correlatie te bestaan tussen de breedte van de zona glomerulosa en de produktie van aldosteron in vitro. Dit wordt door onze resultaten geheel bevestigd.

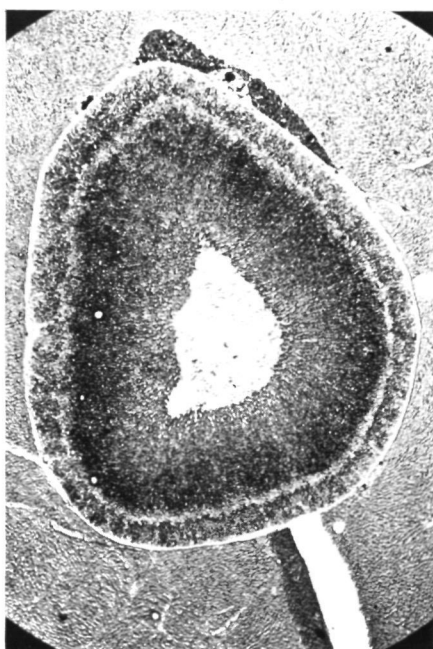
MÜLLER (1965) vond, gebruik makend van een dubbel-isotoop methode, geen duidelijk effect van natriumdeficiëntie in vivo op de aldosteronproduktie in vitro. Deze onderzoeker vermeldt in zijn studie geen gegevens over de samenstelling van het natriumhoudende dieet. De aldosteronproduktie van de dieren die het "normal diet" ontvingen, bedroeg gemiddeld  $3,5 \mu\text{g}/100 \text{ mg}/2 \text{ uur}$ . Deze waarde is ongeveer twee keer zo hoog als die, welke door ons voor de overeenkomende groep



A



B



C

Fig.24. Invloed van het natriumgehalte van het dieet op de breedte van de zona glomerulosa van de bijnier van de rat. De opnamen hebben betrekking op vriescoupes ( $7\mu$ ) gekleurd met Sudan Black. A. Na twee weken natriumhoudend dieet. B. Na twee weken natriumarm dieet. C. Na vijf weken natriumarm dieet.

werd gevonden. Het lijkt daarom waarschijnlijk dat het natriumhoudende voer dat door MÜLLER werd aangewend relatief natriumarm is geweest. Ook worden in de studie van deze onderzoeker geen histologische gegevens vermeld. Het is daarom moeilijk de resultaten van MÜLLER met de onze te vergelijken.

De resultaten van een experiment, waarin de aldosteronproductie in vitro werd gemeten bij verschillende kaliumconcentraties van het incubatiemedium zijn weergegeven in figuur 25. Voor dit experiment werd bijnierweefsel gebruikt van ratten, die gedurende één week waren gevoerd met het natriumdeficiënte dieet. Bij de gebruikelijke kaliumconcentratie (5,9 meq/liter) was de aldosteronproductie 3,35  $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  weefsel/2 uur. Bij een kaliumconcentratie van 3,4 meq/liter werd een lagere en bij kaliumconcentraties van 8,4 en 9,9 meq/liter een hogere aldosteronproductie gemeten. Een verdere verhoging van de kaliumconcentratie deed de aldosteronproductie weer afnemen.

Hoewel voor elke kaliumconcentratie slechts één meting werd verricht, wordt het experiment hier vermeld vanwege de volledige overeenstemming met de resultaten van MÜLLER (1965) in een soortgelijk experiment. Deze onderzoeker vond bij kaliumconcentraties van 3,4; 5,9; 8,4 en 13 meq/liter aldosteronproducties van respectievelijk 2,5; 4; 7,5 en 4  $\mu\text{g}/100\text{mg}/2\text{ uur}$ . Bij deze experimenten werd voor de meting eveneens gebruik gemaakt van een dubbel-isotoop methode. Zowel in de waarnemingen van MÜLLER als in onze eigen proeven werd bij een kaliumconcentratie van circa 9 meq/liter een maximale productie waargenomen.

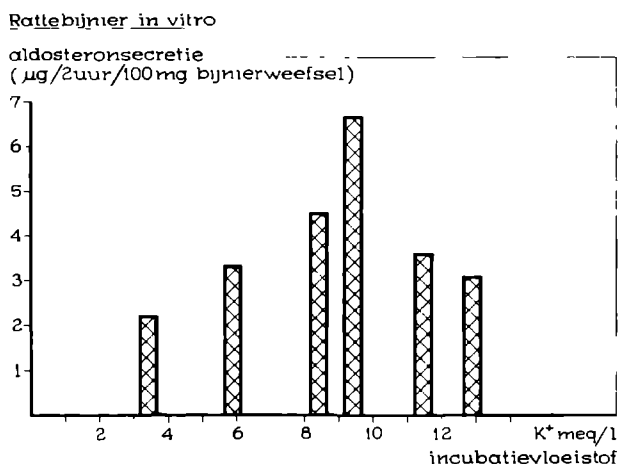


Fig.25. Invloed van de verandering van kaliumconcentratie in het incubatiemedium op de productie van aldosteron in vitro door bijnierweefsel van de rat

De gemiddelde waarde van de  $\Delta$ -ratio bij 30 metingen van aldosteron in incubatiemedia bedroeg +2,60% (S.D. 3,99). De hydrolyse-factor werd in 9 gevallen bepaald en bedroeg gemiddeld 2,02 (S.D. 0,08). Hieruit mag geconcludeerd worden, dat de in dit proefschrift beschreven methode voor de bepaling van aldosteron alleszins geschikt is voor meting van de aldosteronproductie door bijnierweefsel in vitro.

## SAMENVATTING

De mineralocorticoïde activiteit van bijnierschorsextracten wordt grotendeels veroorzaakt door aldosteron. De isolering van dit sterk werkzame corticosteroïd bracht vele problemen met zich mee, voornamelijk omdat het hormoon chemisch vrij labiel is en bovendien in zeer lage concentraties in biologische media voorkomt. In hoofdstuk I is de geschiedenis van de ontdekking van het hormoon geschetst.

Slechts circa één duizendste gedeelte van het aldosteron, dat door de bijnier van de mens wordt geproduceerd, wordt als vrij aldosteron met de urine uitgescheiden. Ongeveer één tiende deel van het geseceerneerde aldosteron wordt zonder voorafgaande verandering aan glucuronzuur gekoppeld. Dit zogenaamde 3-oxo-conjugaat wordt met de urine uitgescheiden en kan op eenvoudige wijze worden gehydrolyseerd waarbij "oorspronkelijk" aldosteron vrijkomt. De excretie van het 3-oxo-conjugaat wordt veelal als maatstaf gebruikt voor de totale aldosteronproductie. In hoofdstuk II zijn literatuurgegevens vermeld over de structuur van het 3-oxo-conjugaat (en andere metabolieten), aard en plaats van de stofwisseling en de veranderingen in het metabolisme van aldosteron onder pathologische omstandigheden.

Een betrouwbare bepaling van de secretiesnelheid van aldosteron kan geschieden door meting van de isotoopdilutie in vivo, na injectie van radioactief gemerkt aldosteron. De isotoopdilutie wordt gemeten door bepaling van de specifieke activiteit van een met de urine uitgescheiden metaboliet. Het 3-oxo-conjugaat is hiervoor het meest geschikt.

De kwantitatieve bepaling van aldosteron wordt tot op heden zeer bemoeilijkt doordat geen specifieke chemische reactie op het hormoon bekend is. Het is daarom geboden vóór de uiteindelijke meting het steroïd in volledig zuivere vorm uit het biologische milieu af te zonderen. Voor de isolering zijn verschillende opeenvolgende chromatografische zuiveringen noodzakelijk. In hoofdstuk III zijn de diverse bepalingsmethoden besproken die voor aldosteron zijn ontwikkeld. Speciale aandacht is besteed aan de methoden waarin aldosteron radiometrisch wordt bepaald. Bij de laatstgenoemde methoden wordt van aldosteron een radioactief derivaat gevormd door reactie met een gemerkt reagens. Indien de specifieke activiteit van het reagens en de reactievergelijking bekend zijn, kan na zuivering van het derivaat van alle aspecifieke radioactieve

verbindingen de gewichtshoeveelheid van het aldosteron worden afgeleid uit meting van de ingevoerde radioactiviteit. Voor tijdens de zuivering optredende verliezen wordt gecorrigeerd door middel van een tweede isotoop, dat is ingebouwd in een zogenaamde "verliesindicator".

In hoofdstuk IV is de eigen dubbel-isotoop methode beschreven. Bij de ontwikkeling hiervan is uitgegaan van de methode volgens KLIMAN en PETERSON, waarin  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride wordt gebruikt als reagens en  $^3\text{H}$ -aldosteron als verliesindicator. In onze methode wordt vóór acetylering het aldosteron gezuiverd door middel van dunnelaagchromatografie en ná acetylering wordt het diacetaat gezuiverd door middel van dunnelaagchromatografie in combinatie met een papierchromatogram.

Aangezien de uiteindelijke meting bij dubbel-isotoop methoden elke intrinsieke specificiteit mist, is in hoofdstuk V, waarin de betrouwbaarheid van de methode wordt getoetst, ruime aandacht geschonken aan de criteria voor specificiteit. De specificiteit van onze methode bleek uit de volgende feiten: (i) bij registratie van de radioactiviteitsverdeling over het papierchromatogram werd een symmetrische radioactiviteitspiek gevonden op de plaats van aldosterondiacetaat met aan weerszijden weinig of geen aspecifieke radioactiviteit; (ii) de methode voldeed geheel aan het algemeen erkende criterium, dat na voortgezette chromatografie de isotopenverhouding constant is; (iii) na selectieve afsplitsing van één van de twee  $^{14}\text{C}$ -acetaatgroepen en zuivering van het gevormde  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -monoacetaat benaderde het quotiënt van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio van het monoacetaat en die van het oorspronkelijke  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat zeer dicht de theoretische waarde van 2,00. Vooral het laatste punt is een bijzonder sterke aanwijzing dat met de methode een hoge graad van zuiverheid van het  $^3\text{H}$ -aldosteron- $^{14}\text{C}$ -diacetaat wordt bereikt.

Bij onderzoek naar de isotopenverhouding in opeenvolgende delen van de chromatografische vlek werd, uitgaande van de startzijde, een systematische daling van de  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio waargenomen. Dit verschijnsel is het gevolg van isotoopfractionering en maakt een veelal gebruikt criterium van zuiverheid onbruikbaar. De isotoopfractionering, die een potentiële foutenbron vormt, is tijdens dunnelaagchromatografie, althans in de door ons gebruikte systemen, aanzienlijk geringer dan tijdens papierchromatografie. Daar in onze methode hoofdzakelijk gebruik wordt gemaakt van dunnelaagchromatografie, speelt de genoemde foutenbron slechts een geringe rol.

Omtrent de onderste gevoeligheidsgrens van de methode werd een indruk verkregen door de bepaling uit te voeren op urine van bijnierloze patiënten. De meetwaarden die aldus werden verkregen bedroegen gemiddeld  $0,3 \mu\text{g}/24\text{-uurs}$  urine. De onderste gevoeligheidsgrens kan, gebaseerd op deze blancowaarde, gesteld worden op  $0,6 \mu\text{g}/24\text{-uurs}$  urine, bij gebruik van  $^{14}\text{C}$ -azijnzuuranhydride met een specifieke acti-

viteit van 2mC/mmol.

Bij toetsing van de reproduceerbaarheid van de methode werd een grootste standaardafwijking binnen de groepen waargenomen van 6,9%. De resultaten van experimenten betreffende de reproduceerbaarheid, geven mede een indruk omtrent de nauwkeurigheid, aangezien mogelijke systematische fouten als gevolg van aspecificiteit en onjuiste bepaling der specifieke activiteit van het reagens kunnen worden opgemerkt. Deze conclusie wordt gesteund door de resultaten van "recovery"-experimenten.

Tenslotte zijn in hoofdstuk VI enige toepassingen van de methode beschreven. Deze toepassingen dienen als illustratie van de aldosteron-excretie- en secretiewaarden, die kunnen worden verwacht bij normale personen. Bij hen werden metingen verricht tijdens gebruik van een gestandaardiseerd natriumhoudend en natriumarm dieet. Bij een aantal van deze personen werd ook het effect van bekende stimulators op de aldosteronproduktie als ACTH en angiotensine onderzocht. Bovendien bleek uit metingen van de aldosteronproduktie door geïsoleerd bijnierweefsel van ratten, dat de beschreven methode ook geschikt is voor studie van aldosteronproduktie onder experimentele omstandigheden in vitro.



## SUMMARY

The mineralocorticoid activity of adrenal extracts is primarily attributable to aldosterone. The isolation of this strongly active hormone was attended by many difficulties, primarily related to its relative instability and its low concentration in biological materials. The history of its discovery is outlined in chapter I.

No more than approximately 1/1000 of the aldosterone produced in the adrenal is excreted into the urine as free aldosterone. Without undergoing previous change, about 1/10 of secreted aldosterone becomes bound with glucuronic acid and is excreted into the urine as the so-called 3-oxo-conjugate. The aldosterone thus excreted is easily released by acid hydrolysis and is often taken as an index of the amount of aldosterone secreted by the adrenal cortex. Chapter II deals with literature concerning the structure of the 3-oxo-conjugate and other metabolites of aldosterone and concerning aldosterone metabolism under normal and pathological conditions. Aldosterone secretion rates can be determined reliably by estimating isotope dilution *in vivo* after injection of labelled aldosterone. The degree of isotope dilution is calculated from the specific activity of a metabolite excreted in the urine, for which the 3-oxo-conjugate is best suited.

At the present time a chemical reaction specific for aldosterone is not available and therefore complete isolation of the steroid from biological media must precede final measurements. The separation of aldosterone has been made possible by consecutive chromatographic separations. The methods of purification and final reactions used for determination of aldosterone are considered in chapter III with particular attention being given to isotope techniques in which a radioactive aldosterone derivative is prepared with a labelled reagent. If the specific activity of the labelled reagent and the stoichiometric relationship are known and the separation of the derivative from all non-specific radioactive compounds is accomplished, the amount of aldosterone can be calculated from the amount of radioactivity introduced into the derivative. Aldosterone containing a second isotope is added to the sample, thus serving as an indicator of steroid loss during the procedure.

The author's double isotope method is described in chapter IV. This technique is based on the method of KLIMAN and PETERSON and employs  $^{14}\text{C}$ -acetic acid anhydride as the labelling reagent together with  $^3\text{H}$ -aldosterone as the indicator for steroid loss. Aldosterone is purified by thin layer chromatography, is then acetylated, whereupon the aldo-

sterone diacetate is freed from impurities by a combination of thin layer- and paper chromatography.

Since the double isotope assay lacks intrinsic specificity, chapter V, in which the tests on the reliability of the method are described, is focused on criteria for specificity. The following three observations provide evidence for the specificity of the method: (i) in scanning the radioactivity on the paper chromatogram, a symmetrical peak of activity was found, which coincided with the U.V.-absorbing aldosterone diacetate spot, with no significant degree of aspecific activity adjacent to this spot; (ii) the isotope ratio did not change subsequent to continued chromatography; (iii) following selective removal of one of the two  $^{14}\text{C}$ -acetate groups and purification of the remaining monoacetate, the  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratio of the monoacetate was almost exactly twice that of the original  $^3\text{H}$ -aldosterone- $^{14}\text{C}$ -diacetate. The third point constitutes a particularly strong indication that the purity of the aldosterone diacetate obtained with this method is high.

The  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -ratios in the eluates of consecutive sections of the chromatographic spot regularly decreased from the leading to the trailing edge. This observation is a consequence of isotope fractionation during the chromatographic separation and invalidates a frequently used criterion of purity. The isotope fractionation, which constitutes a potential source of error, was less pronounced after thin layer- than after paper chromatography.

An estimate of the lower limit of sensitivity was obtained by determination on urine from adrenalectomized patients. Since the apparent excretion rate for the urine samples averaged  $0.3\text{ }\mu\text{g}/24\text{-hour}$  urine, the lower limit of sensitivity can be set at  $0.6\text{ }\mu\text{g}/24\text{-hour}$  urine. This value was obtained using  $^{14}\text{C}$ -acetic acid anhydride with a specific activity of  $2\text{ mC}/\text{mmol}$ , but could be further lowered by employing a reagent with a higher specific activity.

In a number of replicate assays the average relative standard deviation was  $6.9\%$ . This estimate of the methods reproducibility simultaneously provides information concerning its accuracy because possible systematic errors resulting from the presence of aspecific  $^{14}\text{C}$ -material or from inaccurate determination of the specific activity of the reagent can be detected. The accuracy of the method is further supported by the results of recovery experiments.

The final chapter gives some applications of the method. Aldosterone excretion and secretion values for normal individuals on sodium rich and sodium poor diets are shown. In a few of these persons the effects of known stimulators of aldosterone production, such as ACTH and angiotensin, were investigated. Furthermore measurements made on production of aldosterone by isolated rat adrenal tissue indicate that the present method is also suitable for the study of aldosterone formation and metabolism under experimental conditions in vitro.

## BIBLIOGRAFIE

- ABELSON D. en P.K.BONDY, Arch.Biochem. 57 (1955) 208
- ADAMEC O., J.MATIS en M.GALVANEK, Steroids 1 (1963) 495
- ADDISON Th., The London Med. Gazette 8 (1849) 517
- ADDISON Th., On the constitutional and local effects of disease of the supra renal capsules, Samuel Highly - London, 1855
- AMES R.P., A.J.BORKOWSKI, A.M.SICINSKI en J.H.LARAGH, J.Clin. Invest. 7 (1965) 1171
- AUDRIN P., F.C.FOUSSARD, Ch.BOURGOIN, L.JUNG en P.MORAUD, Rev.Franc. Etud.Clin.Biol. 8 (1963) 507
- AVIVI P., S.A.SIMPSON, J.F.TAIT en J.K.WHITEHEAD, Proc.2nd Radioisotope Conf., Oxford 1 (1954) 313
- AXELRAD B.J., J.E.CATES, B.B.JOHNSON en J.A.LUETSCHER, Brit. Med.J. 1 (1955) 196
- AYRES P.J., O.GARROD, S.A.SIMPSON en J.F.TAIT, Biochem. J. 65 (1957) 639
- AYRES P.J., J.BARLOW, O.GARROD, A.E.KELLIE, J.F.TAIT, S.A.S. TAIT en G.WALKER, in: A.MULLER en C.O'CONNOR (Eds.), An International Symposium on Aldosterone, Churchill Ltd., London, 1958 p.73
- AYRES P.J., J.EICHHORN, O.HECHTER, N.SABA, J.F.TAIT en S.A.S. TAIT, Acta Endocr. 33 (1960) 27
- BARTTER F.C., J.H.MILLS en D.S.GANN, J.Clin.Invest. 39 (1960) 1330
- BAULIEU E.E., M.de VIGAN en M.F.JAYLE, Ann.Endocr. 17 (1956) 88
- BAUMANN E.J. en S.KURLAND, J.Biol.Chem. 71 (1927) 281
- BENNETT R.D. en E.HEFTMANN, J.Chromatogr. 9 (1962) 348
- BENRAAD Th.J. en P.W.C.KLOPPENBORG, Steroids 3 (1964) 671
- BENRAAD Th.J. en P.W.C.KLOPPENBORG, Clin.Chim.Acta 12 (1965) 565
- BENRAAD Th.J., M.L.A.VERWILGHEN en P.W.C.KLOPPENBORG, Clin.Chim. Acta 13 (1966) 787
- BIEDL A., Innere Sekretion. Ihre physiologischen Grundlagen und Ihre Bedeutung für die Pathologie. Urban-Schwarzenberg, Vienna, 1913
- BOBBITT J.M., Thin Layer Chromatography, Reinhold & Co, New York, 1963
- BOJESSEN E., A.S.KESTON en M.CARSOTIS, Abstr. XIX Intern.Congr. Physiol.Sci., Montreal (1953) p.220

- BOJESEN E. en H.DEGN, Abstr. 1st Intern.Congr.Endocr., Copenhagen (1960) p.1057
- BORTH R., Ciba Found.Coll.Endocr. 2 (1952) 45
- BOUGAS J., C.FLOOD, B.LITTLE, J.F.TAIT, S.A.S.TAIT en R.UNDERWOOD, in: E.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) Aldosterone, Blackwell, Oxford, 1964 p.25
- BRAY G.A., Anal. Biochem. 1 (1960) 279
- BROOKS R.V., Mem.Soc. Endocrin. 8 (1960) 9
- BROWN-SÉQUARD, M.E., C.R.Acad. Sci. (Paris) 43 (1856) 422
- BRUINVELS J., Experientia 19 (1963) 551
- BRUINVELS J., Dissertatie Utrecht, 1965
- BURTON R.B., A.ZAFFARONI en E.H.KEUTMANN, J.Biol.Chem. 188 (1951) 763
- BUSH E.T., Anal. Chem. 36 (1964) 1084
- BUSH I.E., Biochem. J. 50 (1952) 370
- BUSH I.E. en A.A.SANDBERG, J.Biol.Chem. 205 (1953) 783
- BUSH I.E., The Chromatography of Steroids, Pergamon Press, Oxford, 1961
- CADE R. en Th.PERENICH, Amer.J.Physiol. 208 (1965) 1026
- CAMARGO C.A., A.J.DOWDY, E.W.HANCOCK en J.A.LUETSCHER, J.Clin.Invest. 44 (1965) 356
- CARR H.F. en H.M.WOTIZ, Biochim. Biophys. Acta 71 (1963) 178
- CARTLAND G.E. en M.H.KUIZENGA, Amer.J.Physiol. 117 (1936) 678
- CAVINA G. en C.VICARI, in: G.B.MARINI-BETTOLO (Ed.) Thin Layer Chromatography, Elsevier Amsterdam, 1964
- CEJKA V. en E.M.VENNEMAN, Clin.Chim. Acta 11 (1965) 188
- CEJKA V., E.M.VENNEMAN, N.BELT-v.d.BOSCH en P.D.KLEIN, J. Chromatogr. (1966) in druk
- CERNY V., J.JOSKA en L.LABLER, Collect.Czechoslov.Chem.Comm. 26 (1961) 1658
- CHEN P.S., Anal.Chem. 31 (1959) 292
- COGLAN J.P., B.HUDSON, M.WINTOUR en A.DULMANIS, Proc. 2nd. Int.Congr. Endocr., London 1964, in: S.TAYLOR (Ed.) Elsevier Amsterdam, 1965 p.275
- COHEN R.B. en J.D.CRAWFORD, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 109 (1962) 211
- COPE C.L., G.NICOLIS en B.FRASER, Clin.Sci. 21 (1961) 367
- COPE C.L. en J.PEARSON, Clin.Sci. 25 (1963) 331
- COPE C.L., in: E.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) Aldosterone, Blackwell, Oxford, 1964 p.73
- COPPAGE W.S., D.P.ISLAND, M.SMITH en G.W.LIDDLE, J.Clin.Invest. 39 (1959) 2101
- COPPAGE W.S., D.P.ISLAND, A.E.COONER en G.W.LIDDLE, J. Clin. Invest. 41 (1962) 1672
- DEANE H.W., J.H.SHAW en R.O.GREEP, Endocrinology 43 (1948) 133

- DEMING Q.B. en J.A.LUETSCHER, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 73 (1950) 171
- DEMOLE E., J.Chromatogr. 6 (1961) 2
- DEVIS R., Ann.Biol.Clin. 23 (1965) 157
- DICZFALUSY E., Acta Endocr. Suppl. 31 (1957) 11
- DIXON W.J. en F.J.MASSEY, Jr., Introduction to Statistical Analysis, Ed.2, Mc Graw-Hill Book Co., Inc. New York, 1957, p.147
- DORFMAN R.I., Methods in Hormone Research. Academic Press, New York - London, 1962
- DORFMAN R.I. en F.UNGAR, Metabolism of steroid hormones. Academic Press, New York - London, 1965
- DYRENFURTH I. en E.H.VENNING, Endocrinology 64 (1959) 648
- EBERLEIN W.R. en A.M.BONGIOVANNI, Arch.Biochem. 59 (1955) 90
- EISENSTEIN A.B. en P.M.HARTROFT, Endocrinology 60 (1957) 634
- ENGEL L.L., Physical properties of the steroid hormones. Pergamon Press, Oxford 1963
- EVERSE J.W.R. en P.DE FREMERY, Acta Brev.Neerl. 2 (1932) 152
- FEHER T., Microchim. Acta I (1965) 105
- FLOOD C., D.LAYNE, S.RAMCHARAN, E.ROSSIPAL, J.F.TAIT en S.A.S.TAIT, Acta Endocr. 36 (1961) 237
- FREIMUTHU., B.ZAWATA en M.BÜCHNER, Acta Biol.Med.German 13 (1964) 624
- GANIS F.M., M.W.HENDRICKSON, P.D.GIUNTA en J.W.HOWLAND, AEC Research and Development Report UR-601, Univ. of Rochester, N.Y., 1961
- GARST J.B., N.P.SHUMWAY, H.SCHWARTZ en G.L.FARRELL, J.Clin. Endocr. 20 (1960) 1351
- GERDES H. en W.STAIB, Klin.Wschr. 43 (1965a) 744
- GERDES H. en W.STAIB, Klin.Wschr. 43 (1965b) 789
- GIRARD A. en G.SANDULESCO, Helv. Chim.Acta 19 (1936) 1095
- GIROUD C.J.P., M.SAFFRAN, A.V.SCHALLY, J.STACHENKO en E.H.VENNING, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 92 (1956) 855
- GOLD N.I. en J.F.CRIGLER, J.Clin.Endocr. 26 (1966) 133
- GOLDMAN M.L., E.RONZONI en H.A.SCHROEDER, Endocrinology 58 (1956) 57
- GORNALL A.G., in discussie LANDAU c.s., Recent Progr.Hormone Res. 17 (1961) 282
- GOTTFRIEDH., in: M.B.LIPSETT (Ed.) Gaschromatography of steroids in biological fluids. Plenum Press, New York, 1965 p.89
- GOWENLOCK A.H., Mem.Soc. Endocr. 8 (1960) 77
- GROLLMAN A., Cold Spring Harbor Symp. on Quant.Biology 5 (1937) 313
- GRUNDY H.M., S.A.SIMPSON en J.F.TAIT, Nature 169 (1952) 795
- GURPIDE E, J.MANN, R.L.VANDEWIELE en S.LIEBERMAN, Acta Endocr. 39 (1962) 213

- HARROP G.A., L.J.SOFFER, R.ELLSWORTH en J.H.TRESCHER, J. Exp. Med. 58 (1933) 17
- HARROP G.A., W.M.NICHOLSEN en H.STRAUSS, J.Exp.Med. 64 (1936) 233
- HARTMAN F.A., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 23 (1926) 467
- HARTMAN F.A., K.A.BROWNELL, W.E.HARTMAN, G.A.DEAN en C.G. MacARTHUR, Amer.J.Physiol. 86 (1928) 353
- HARTMAN F.A. en K.A.BROWNELL, Science 72 (1930) 76
- HARTMAN F.A. en H.J.SPOOR, Endocrinology 26 (1940) 871
- HARTROFT P.M. en A.B.EISENSTEIN, Endocrinology 60 (1957) 641
- HARTROFT P.M. en W.S.HARTROFT, J.Exp.Med. 102 (1955) 205
- HENCH P.S., E.C.KENDALL, C.H.SLOCUMB en H.F.POLLEY, Proc. Staff Meetings Mayo Clinic 24 (1949) 181
- HERMANEK S., V.SCHWARZ en Z.CAKAN, Collect.Czechoslov.Chem. Comm. 26 (1961) 1669
- HOLZBAUER M. en M.VOGT, J.Physiol. 157 (1961) 137
- HORTON R. en J.F.TAIT, Proc. 2nd.Int.Congr.Endocr., London 1964, in: S.TAYLOR (Ed.) Elsevier Amsterdam, 1965, p.262
- HURTER R. en J.D.N.NABARRO, Acta Endocr. 33 (1960) 168
- INGLE D.J., Proc.DSoc.Exp.Biol.Med. 31 (1933) 163
- INGLE D.J., Amer.J.Physiol. 116 (1936) 622
- JENSEN E.V. en H.J.JACOBSON, Recent Progr.Hormone Res. 18 (1962) 387
- JONES K.M., R.LLOYD-JONES, A.RIONDEL, J.F.TAIT, S.A.S.TAIT, R.D.BULBROOK en F.C.GREENWOOD, Acta Endocr. 30 (1959) 321
- JONGE H.de, Inleiding tot de Medische Statistiek II. Ned.Instituut voor Praeventieve Geneeskunde, Leiden 1960 p.396, 413
- KAPLAN N.M., Clin.Research 11 (1963) 221
- KELLY W.G., L.BANDI, J.N.SCHOOLERY en S.LIEBERMAN, Biochemistry 1 (1962a) 712
- KELLY W.G., L.BANDI en S.LIEBERMAN, Biochemistry 1 (1962b) 792
- KELLY W.G., L.BANDI en S.LIEBERMAN, Biochemistry 2 (1963) 1243
- KELLY W.G. en S.LIEBERMAN, in: E.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) Aldosterone, Blackwell, Oxford, 1964, p.103
- KENDALL E.C., Cold Spring Harbor Symp. on Quant.Biology 5 (1937) 302
- KENDALL E.C., J.A.M.A. 116 (1941) 239
- KESTON A.S., S.UDENFRIEND en R.K.CANNAN, J.Amer.Chem.Soc. 69 (1947) 3151
- KESTON A.S. en J.LOSPALLUTO, Fed.Proc. 10 (1951) 207
- KIRSCHNER M.A. en M.B.LIPSETT, J.Lipid. Res. 6 (1965) 7
- KLEIN P.D., Eight Symposium on Advances in Tracer Methodology, November 1963, in: S.ROTHCHILD (Ed.) Advances in Tracer Methodology Vol.2, Plenum Press, New York, 1965 p.145
- KLEIN P.D., D.W.SIMBORG en P.A.SZCZEPANIK, Pure Appl. Chem.

- 8 (1964) 357
- KLIMAN B. en R.E.PETERSON, Fed.Proc. 17 (1958) 255
- KLIMAN B., J.RAHILL en F.C.BARTTER, Endocrine Soc.Abst. 43th meeting 1961, 75
- KLIMAN B. en R.E.PETERSON, J.Biol.Chem. 235 (1960) 1639
- KLIMAN B. en D.W.FOSTER, Anal.Biochem. 3 (1962) 403
- KLIMAN B., Atomlight, Issue 32, New Engl.Nuclear Corp., 1963
- KLIMAN B., in: M.B.LIPSETT (Ed.) Gaschromatography of steroids in biological fluids. Plenum Press, New York, 1965 p.125
- KLOPPENBORG P.W.C., Dissertatie Nijmegen, 1966
- KOCZOREK K.J., H.P.WOLFF en M.L.BEER, Klin.Wschr. 35 (1957) 497
- KOCZOREK K.J. en H.P.WOLFF, Verh.Dtsch. Ges. Inn. Med. 65 (1959) 614
- KÖDDING R., H.P.WOLFF, J.KARL en M.TORBICA, Symposion Dtsch. Ges. Endokrin. 8 (1961) 321
- KOWARSKI A., J.FINKELSTEIN, B.LORAS en C.J.MIGEON, Steroids 3 (1964) 95
- KUMAR D., L.A.W.FELTHAM en A.G.GORNALL, Lancet i (1959) 541
- LAIDLAW J.C., J.L.RUSE en A.G.GORNALL, J.Clin.Endocr. 22 (1962) 161
- LAPLANTE C. en J.STACHENKO, Canad.J.Biochem. 44 (1966) 85
- LARAGH J., tijdens discussie in: E.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) Aldosterone, Blackwell, Oxford 1964, p.98
- LARAGH J.H., J.E.SEALEY en P.D.KLEIN, Trans. IAEA Symp. on Radiochem. Methods of Analysis, Salzburg, Austria, 1964; IAEA 2 (1965) 253
- LAUMAS K.R., J.F.TAIT en S.A.S.TAIT, Acta Endocr. 36 (1961) 265
- LAUMAS K.R., J.F.TAIT en S.A.S.TAIT, Acta Endocr. 36 (1961) 469
- LAYNE D.S., C.J.MEYER, P.S.VAISHWANAR en G.PINCUS, J.Clin. Endocr. 22 (1962) 107
- LEWIS R.A., D.KUHLMAN, C.DELBUE, G.F.KOEPF en G.W.THORN, Endocrinology 27 (1940) 971
- LIDDLE G.W., mondelinge mededeling aan J.F.TAIT en S.A.S.TAIT, in: Methods in Hormone Research (R.I.Dorfman Ed.) Academic Press New York-London, 1962
- LISBOA B.P., Acta Endocr. 43 (1963) 47
- LISBOA B.P., J.Chromatogr. 13 (1964) 391
- LOEB R.F., Science 76 (1932) 420
- LCEB R.F., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 30 (1933) 808
- LOEB R.F., D.W.ATCHLEY, E.M.BENEDICT en J.LELAND, J.Exp. Med. 57 (1933) 775
- LORAIN J.A., The clinical application of hormone assay. Edinburgh-Livingstone, 1958
- LUETSCHER J.A., A.DOWDY, J.HARVEY, R.NEHER en A.WETTSTEIN,

- J.Biol. Chem. 217 (1955) 505
- LUETSCHER J.A., A.J.DOWDY, A.M.CALLAGHAN en A.P.COHN, Trans. Ass. Amer. Physicians 75 (1962) 293
- MADER W.J. en R.R.BUCK, Anal.Chem. 24 (1952) 666
- MANGOLD H.K., J.Amer.Oil Chem.Soc. 38 (1961) 708
- MARINE D. en E.J.BAUMANN, Amer. J.Physiol. 81 (1927) 86
- MARTIN J.D. en J.H.MILLS, Brit.Med.J. 2 (1956) 571
- MARX A.J. en H.W.DEANE, Endocrinology 73 (1963) 317
- MASON H.L., Endocrinology 25 (1939) 405
- MATIS J., O.ADAMEC en M.GALVANEK, Nature 194 (1962) 477
- MATTHEWS J.S., V.PEREDA en P.AGUILERA, J.Chromatog. 9 (1962) 331
- MATTOX V.R., H.L.MASON en A.ALBERT, J.Biol.Chem. 218 (1956) 358
- MATTOX V.R. en H.L.MASON, J.Biol.Chem. 223 (1956) 215
- MATTOX V.R. en M.L.LEWBART, J.Clin.Endocr. 19 (1959) 1151
- McCARTHY J.L., A.L.BRODSKY, J.A.MITCHELL en R.F.HERRSCHER, Anal.Biochem. 8 (1964) 164
- MERITS I.J., Lipid Res. 3 (1962) 126
- MEYER C.I.J., D.S.LAYNE, J.F.TAIT en G.PINCUS, J.Clin.Invest. 40 (1961) 1663
- MILLS J.N., Brit.Med. Bull. 18 (1962) 170
- MOOLENAAR A.J., Acta Endocr. 25 (1957) 161
- MOSIER H.D. en C.P.RICHTER, Endocrinology 62 (1958) 268
- MULLER A., tijdens discussie: in: E.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) Aldosterone, Blackwell, Oxford 1964, p.93
- MÜLLER J., Acta Endocr. 48 (1965) 283
- NEHER R. en A.WETTSTEIN, Acta Endocr. 18 (1955) 386
- NEHER R., tijdens discussie in: Mem.Soc.Endocr. 8 (1960) 80
- NEHER R. in: (H.NOWAKOWSKY Ed.) Aldosteron, Neuntes Symposium des Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963, p.21
- NEHER R., Steroid Chromatography, Elsevier Publishing Company Amsterdam, 1964
- NEW M.I., B.MILLER en R.E.PETERSON, J.Clin.Invest. 45 (1966) 412
- NISHIKAZE O. en H.STAUDINGER, Klin.Wschr. 40 (1962) 1014
- NISHIKAZE O., R.ABRAHAM en H.STAUDINGER, J.Biochem. 54 (1963) 427
- NOWACZYNSKI W.J., M.GOLDNER en J.GENEST., J.Lab.Clin.Med. 45 (1955) 818
- NOWACZYNSKI W.J., E.KOIW en J.GENEST, Can.J.Biochem. 35 (1957) 425
- NOWOTNY E., R.ABRAHAM en H.STAUDINGER, Z.Klin.Chem. 3 (1965) 8
- OERTEL G.W., Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Plasma, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962



- OERTEL G.W., *Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Harn*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1964
- OKITA J.J., F.KABARA en G.V.LEROY, *Nucleonics* 15 (1957) 111
- PASQUALINI J.R., J.C.LEGRAND en M.F.JAYLE, *Acta Endocr.* 43 (1963) 67
- PASQUALINI J.R., *C.R.Acad.Sci. (Paris)* 259 (1964) 934
- PASQUALINI J.R., P.MAUVAIS-JARVIS, M.LEGRAIN, G.LAFOSCADE en M.F.JAYLE, *Ann.Endocr.* 25 (1964) 433
- PASQUALINI J.R., F.UHRICH en M.F.JAYLE, *Biochim.Biophys. Acta* 104, (1965) 515
- PETERSON R.E., in: E.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) *Aldosterone*, Blackwell, Oxford, 1964, p.145
- PETERSON R.E. en E.A.EILERS, *Proc.2nd.Int.Congr.Endocr.*, London 1964, in: S.TAYLOR (Ed.) Elsevier Amsterdam, 1965 p.267
- PIFFNER J.J., W.W.SWINGLE en H.M.VARS, *J.Biol.Chem.* 104 (1934) 701
- QUESENBERRY R.O. en F.UNGAR, *Anal.Biochem.* 8 (1964) 192
- RANDERATH K., *Dünnschicht Chromatografie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962
- REICH M., *Austral. J.Exptl. Biol. Med. Sci.* 36 (1958) 555
- REICHSTEIN T., *Helv.Chim.Acta* 19 (1936) 223, 1107
- REICHSTEIN T. en C.W.SHOPPEE, *Vitamins and Hormones I*, Academic Press, New York - London, 1943 p.345
- RINSLER M.G. en B.RIGBY, *Brit.Med.J.* 2 (1957) 966
- ROGOFF J.M. en G.N.STEWART, *J.A.M.A.* 92 (1929) 1569
- ROMANI J.D., *Presse Médicale* 66 (1958) 837
- ROSS E.J., *Aldosterone in clinical and experimental medicine*. Blackwell, Oxford, 1959
- RÜMKE Chr.L., C.van EEDEN, *Statistiek voor Medici*, Stafleu, Leiden (1960)
- SCHMIDLIN J., G.ANNER, J.R.BILLETER en A.WETTSTEIN, *Experientia* 11 (1955) 363
- SCHWARZ J. en R.BLOCH, *Ann. Endocr.* 25 (1964) 113
- SIEGENTHALER W.E., A.DOWDY en J.A.LUETSCHER, *J.Clin.Endocr.* 22 (1962) 172
- SIEGENTHALER W.E., R.E.PETERSON en G.W.FRIMPTER, in: A.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) *Aldosterone*, Blackwell, Oxford 1964 p.51
- SILVETTE H. en S.W.BRITTON, *Amer.J.Physiol.* 102 (1932) 693
- SIMPSON S.A. en J.F.TAIT, *Endocrinology* 50 (1952) 150
- SIMPSON S.A. en J.F.TAIT, *Mem.Soc.Endocrin.* 2 (1953)
- SIMPSON S.A., J.F.TAIT, A.WETTSTEIN, R.NEHER, J.VON EUW en T.REICHSTEIN, *Experientia* 9 (1953) 333
- SIMPSON S.A., J.F.TAIT, A.WETTSTEIN, R.NEGER, J.von EUW, O.SCHINDLER en T.REICHSTEIN, *Helv.Chim.Acta* 37 (1954) 1163, 1200

- SINGER B., J.Endocr. 19 (1960) 310
- SMITH L.L. en TH.FOELL, J.Chromatogr. 9 (1962) 339
- SOBEL C., R.J.HENRY, O.J.GOLUB en M.RUDY, J.Clin.Endocr. 19 (1959) 1302
- STACHENKO J., C.LAPLANTE en C.J.P.GIROUD, Can.J.Biochem. 42 (1964) 1275
- STAHL E., Dünnschicht-Chromatographie, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962
- STARK G., Arch.Gynaek. 192 (1960) 519
- STARK G., Arch.Gynaek. 197 (1962a) 28
- STARK G., Arch.Gynaek. 197 (1962b) 484
- STARKA L. en J.MALIKOVA, J.Endocr. 22 (1961) 215
- STAUB M.C., J.F.DINGMAN en K.W.FESLER, J.Clin.Endocr. 21 (1961) 148
- SWINGLE W.W. en J.J.PFIFNER, Science 72 (1930) 75
- SWINGLE W.W. en J.J.PFIFNER, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 28 (1931) 510
- TAIT J.F., S.A.SIMPSON en H.M.GRUNDY, Lancet (1952) 122
- TAIT S.A.S. en J.F.TAIT, Mem.Soc. Endocr. 8 (1960) 40
- TAIT J.F. en S.A.S.TAIT in: Methods in Hormone Research (R.I.DORFMAN, Ed.) Academic Press, New York-London, 1962, p.304
- TAIT J.F., tijdens discussie in: E.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) Aldosterone, Blackwell, Oxford, 1964 p.19
- TAIT J.F. en S.BURSTEIN, in: The Hormones, 5, 441. Academic Press, New York 1964. Eds. G.Pincus, K.V.Thimann en E.B.Astwood
- THERVET F., A.SALAS, F.DRAY, J.SEBAOUN, J.C.SAVOIE en G.DREYFUS, Ann.Endocr. 26 (1965) 161
- UDENFRIEND S., J.Biol.Chem. 187 (1950) 65
- ULICK S. en S.LIEBERMAN, J.Amer.Chem.Soc. 79 (1957) 6567
- ULICK S., J.H.LARAGH en S.LIEBERMAN, Trans.Ass. Amer.Physicians 71 (1958) 225
- ULICK S., K.KUSCH en J.T.AUGUST, J.Amer.Chem.Soc. 83 (1961) 4482
- ULICK S., G.L.NICOLIS en K.KUSCH VETTER, in: E.E.BAULIEU en P.ROBEL (Eds.) Aldosterone, Blackwell, Oxford, 1964, p.3
- UNDERWOOD R.H., C.FLOOD, S.A.S.TAIT en J.F.TAIT, J.Clin.Endocr. 21 (1961) 1092
- UNDERWOOD R.H. en J.F.TAIT, J.Clin.Endocr. 24 (1964) 1110
- VAEDTKE J. en A.GAJEWSKA, J.Chromatogr. 9 (1962) 345
- VENNING E.H., V.E.KAZMIN en J.C.BELL, Endocrinology 38 (1946) 79
- VENNING E.H. en J.DYRENFURTH, J.Clin.Endocr. 16 (1956) 426
- VENNING E.H., J.DYRENFURTH, L.LOWENSTEIN en J.BECK, J.Clin. Endocr. 19 (1959) 403
- WAL van der B., Dissertatie Utrécht, 1964
- WATANABE M., C.I.MEEKER, M.J.GRAY, E.A.H.SIMS en S.SOLOMON, J.Clin.Invest. 42 (1963) 1619

WELLS B.B., Proc.Staff Meetings Mayo Clinic 15 (1940) 294  
 WHEELER T.D. en S.VINCENT, Trans.Roy.Soc.Canada XI (1917) 125  
 WINTERSTEINER O. en J.J.PFIFNER, J.Biol.Chem. 116 (1936) 291  
 WOLFF H.P. en M.M.TORBICA, Klin.Wschr. 41 (1963) 40  
 ZAFFARONI A., R.B.BURTON en E.H.KEUTMAN, Science 111 (1950) 6  
 ZAFFARONI A., J.Biol.Chem. 193 (1951) 749  
 ZAFFARONI A., Recent Progr. Hormone Res. 8 (1953) 51

## DANKBETUIGING

Aan het onderzoek dat in dit proefschrift is beschreven hebben een aantal personen een zeer positieve bijdrage geleverd. Gaarne wil ik uiting geven aan mijn dank daarvoor.

Dr. W. J. van Dongen heeft steeds levendige interesse getoond voor het onderzoek en verleende, als directeur van het laboratorium waar dit onderzoek werd verricht, daarbij alle vrijheid voor het bewerken van dit onderwerp. Hiervoor ben ik hem zeer erkentelijk. Prof. Dr. C. L. H. Majoor, heeft dit werk gestimuleerd door blijken van vertrouwen en door mij te laten delen in een aan hem verleende Z. W. O. subsidie.

Dr. J. H. Veerkamp verleende waardevolle medewerking door hulp te bieden bij de radioactiviteitsmetingen en door aanwijzingen te geven bij het bewerken van het manuscript. Op elk gevraagd moment was Drs. J. J. Wellen bereid te discussiëren over de opzet van het onderzoek. Zijn critische zin heb ik ook ter hulp geroepen bij het opstellen van de tekst van dit proefschrift. Dr. A. P. Jansen stelde gastvrij op zijn laboratorium meetapparatuur ter beschikking.

De grote accuratesse, waarmee de heer E. K. Wilms steeds werkt, was van grote waarde bij de ontwikkeling van de aldosteronbepaling. Door de bepalingen met grote precisie uit te voeren hebben Mej. M. H. Roos, Mej. M. W. J. Engels en Mej. M. L. A. Verwilghen een belangrijke bijdrage geleverd. Bij het persklaar maken van het manuscript en de correctie der drukproeven hebben Mej. B. M. G. Keyser en Mej. W. M. T. Sluis zich zeer verdienstelijk gemaakt.

Voorts ben ik dank verschuldigd aan Drs. Ph. van Elteren, directeur van het Instituut voor Wiskundige Dienstverlening aan deze Universiteit, voor zijn adviezen betreffende de statistische bewerkingen. De heer E. de Graaff heeft met kennis van zaken en grote nauwgezetheid bibliografische gegevens verstrekt. De verzorging van de tekeningen was in goede handen van A. D. A. Nooren van de Medische tekenkamer (hoofd Chr. van Huyzen) het fotowerk werd verzorgd door de afdeling Medische Fotografie (hoofd A. Reynen) eveneens aan de Katholieke Universiteit.

## STELLINGEN

### I

De sterke stijging van de secretiesnelheid van aldosteron onder invloed van progestatieve stoffen maakt onderzoek naar de activiteit van het renine-angiotensine-systeem onder deze omstandigheden gewenst.

LAYNE D.S., C.J.MEYER, P.S.VAISHWANAR en G.PINCUS,  
J.Clin.Endocr. 22 (1962) 107

### II

De meetresultaten, waaruit Bledsoe c.s. besluiten, dat de nier aldosteron kan omzetten in het 3-oxo-conjugaat, laten geen enkele conclusie toe.

BLED SOE T., G.W.LIDDLE, A.RIONDEL, D.P.ISLAND, D.  
BLOOMFIELD en B.SINCLAIR-SMITH, J.Clin.Invest. 45 (1966)  
264

### III

Het is zeer de vraag, of de secretiesnelheid van aldosteron bij de hond wel gemeten kan worden met behulp van het 3-oxo-conjugaat, zoals Ganong c.s. vermelden.

GANONG W.F., T.C.LEE, E.E.van BRUNT en E.G.BIGLIERI,  
Endocrinology 76 (1965) 1141

### IV

Bij de bepaling van individuele corticosteroiden na toediening van ACTH worden aan de isoleringsmethoden bijzondere eisen gesteld.

## V

Gláz en Sugár hebben niet overtuigend aangetoond, dat heparine in vivo aan ratten toegediend de in vitro productie van aldosteron remt.

GLÁZ E. en K.SUGÁR, Endocrinology 74 (1964) 159

## VI

De verhoging van de concentratie van 17-hydroxycorticosteroiden in het plasma van caviae, tengevolge van toediening van antifeïne, wordt zeer waarschijnlijk door tussenkomst van ACTH bewerkstelligd.

ANICHKOV S.V., A.N.POSKALENKO en V.E.RYZHENKOV,  
Proc. 1st Intern.Pharmacological Meeting 1 (1961) 1  
PIETERS, W.J.L.M. en Th.J.BENRAAD, niet gepubliceerde  
waarnemingen.

## VII

Een kwantitatieve polarografische bepaling van alkaloiden geeft geen betrouwbare resultaten wanneer bij de kathode-reactie een katalytische waterstof-ontwikkeling plaats vindt.

## VIII

Het verschil tussen het effect van magnesium-pemoline en andere psychotrope stoffen op RNA-polymerase van hersenweefsel in vitro, dat door Glásky en Simon wordt gerapporteerd, kan berusten op de aanwezigheid van magnesium.

GLASKY A.J. en L.N.SIMON, Science 151 (1966) 702

## IX

Bij het conserveren van menselijk bloed door bevriezen moet bij de keuze van stoffen die de erythrocyten beschermen de voorkeur worden gegeven aan glycerol boven polyvinylpyrrolidon.

PERT J.H., P.K.SCHORK en R.MORE, Proc. 9th Congr.Int. Soc.Blood Transf., Mexico 1962; p.47 (1964)  
KRIJNEN H.W., J.J.Fr.M. de WIT, A.C.J.KUIVENHOVEN, J.A.LOOS en H.K.PRINS, Vox Sang. 9 (1964) 559

## X

Het ontbreken van de anorexogene werking van dexamphetamine bij schizofrenen met obesitas, zoals Modell en Hussar beschrijven, kan verklaard worden door de amphetamine antagonistische werking van de neuroleptica waarmee de patiënten worden behandeld.

MODELL W. en A.E.HUSSAR, J.A.M.A. 193 (1965) 275

## XI

De conclusie van Sridhara dat geïsoleerde mitochondriën uit de darmwand van Bombyx Mori geen vetzuren kunnen oxyderen, steunt op onvoldoende experimentele gegevens.

SRIDHARA S., J.Ins.Physiol. 11 (1965) 33

